

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 850**

51 Int. Cl.:

A61K 31/18 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2014 PCT/US2014/047324**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15010106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014 E 14826325 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3021840**

54 Título: **Composiciones para la prevención de una reacción alérgica**

30 Prioridad:

18.07.2013 US 201361847766 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2020

73 Titular/es:

**BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (50.0%)
One Baylor Plaza
Houston, TX 77030-3411, US y
THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TWEARDY, DAVID, J.;
KASEMBELI, MOSES, M.;
XU, MARVIN, X.;
MILNER, JOSH y
BOCCHINI, CLAIRE E.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 796 850 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para la prevención de una reacción alérgica

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º de Serie 61/847.766, presentada el 18 de julio de 2013.

DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN O DESARROLLO CON FONDOS FEDERALES

- 10 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas y esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo P50 CA058183, K08 HL085018-01A2, P50 CA097007, R21 CA149783 y R41 CA153658, otorgadas por los National Institutes of Health. El gobierno de Estados Unidos tiene determinados derechos sobre la invención.

15 **Campo técnico**

La presente invención generalmente se refiere al menos a los campos de la biología celular, biología molecular y medicina.

20 **Antecedentes**

La anafilaxia es una reacción alérgica hiperaguda sistémica que causa más de 1.500 muertes por año en los Estados Unidos. Se asocia con vasodilatación y broncoconstricción intensas, edema laríngeo grave, caída de la presión cardíaca e hipotermia.

- 25 La anafilaxia se puede producir en respuesta a casi cualquier sustancia extraña, aunque los desencadenantes habituales incluyen veneno de insecto, alimentos, medicamentos y en algunos casos semen, látex, cambios hormonales o aditivos alimentarios. Los factores físicos, incluyendo el ejercicio o la temperatura (caliente o fría) también pueden actuar como desencadenantes debido a sus efectos directos sobre los mastocitos. Los eventos inducidos por el ejercicio se asocian con frecuencia con la ingestión de determinados alimentos. En algunos casos, la causa es idiopática.

- 35 El documento US 2010/041685 A1 describe inhibidores de moléculas pequeñas de Stat3 y sus derivados, métodos para inhibir el crecimiento celular mediante el uso de inhibidores de Stat3 y el uso de inhibidores de stat3 para la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

- 40 M. C. Simeone-Penney et al., J. Immunol., 178(10), 2007, 6191-6199 describe el papel del factor de transcripción Stat3 en la mediación del asma y la inflamación alérgica y la acción de este factor de transcripción como regulador epitelial de la respuesta alérgica.

- D. T. Avery et al., Blood, 112(5), 2008, 1784-1793 describe el papel de IL-21 como inductor de la producción de IgE por los linfocitos B humanos estimulados con CD40L no tratados previamente y la dependencia de Stat3 de esta inducción.

- 45 La presente divulgación satisface una necesidad en la técnica de proporcionar compuestos y métodos nuevos para tratar y/o prevenir la anafilaxia en individuos.

Sumario

- 50 La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que se encuentre fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines de información. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

- 55 Las realizaciones de la divulgación incluyen composiciones para su uso en la prevención y/o reducción del riesgo o la gravedad de la anafilaxia. En realizaciones alternativas, una o más composiciones en el presente documento son útiles para el tratamiento de la anafilaxia. En realizaciones de la invención, existen composiciones para su uso en la prevención y/o reducción del riesgo o la gravedad de la anafilaxia asociada con la desgranulación de mastocitos.

- 60 Las realizaciones de la divulgación incluyen o composiciones para su uso en la prevención de anafilaxia en un individuo que se sabe que tiene anafilaxia, sospechoso de tener anafilaxia o en riesgo de tener anafilaxia. Las composiciones incluyen moléculas pequeñas como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el individuo recibe una terapia adicional para la prevención y/o tratamiento de la anafilaxia.

- 65 En al menos determinadas realizaciones, un individuo recibe una cantidad eficaz de la composición para la inhibición de la actividad de los mastocitos, tal como la inhibición de la desgranulación de los mastocitos.

En al menos determinadas realizaciones, un individuo recibe una cantidad eficaz de la composición como una indicación preventiva. La composición puede administrarse continuamente a lo largo de la vida del paciente tras darse cuenta de la necesidad del mismo. La composición puede administrarse solo antes de estar en un entorno que ponga al individuo en riesgo de necesitarla. Por ejemplo, el individuo puede ser susceptible a una reacción alérgica (incluida la anafilaxia) a partir de un alérgeno alimentario particular, pero se le puede administrar la composición antes del consumo del alimento (días, horas o minutos antes del consumo, por ejemplo). A un individuo con susceptibilidad a una reacción alérgica a las picaduras de insectos se le puede administrar la composición antes de la exposición a un entorno o situación en donde el individuo esté en riesgo de ser picado por el insecto. Un individuo puede ser susceptible a una reacción alérgica porque el alérgeno solo está presente en un entorno del individuo en un patrón estacional y en tales casos se puede administrar al individuo la composición antes de y/o durante la estación.

En realizaciones de la divulgación, un individuo recibe más de una dosis de una o más composiciones descritas en el presente documento. La pauta posológica puede separarse en el tiempo por minutos, horas, días, meses o años.

Un individuo que lo necesite puede ser un individuo que tenga al menos un síntoma de reacción alérgica, es susceptible de tener una reacción alérgica, tiene un marcador biológico para tener una reacción alérgica pero nunca ha estado expuesto al alérgeno en un entorno natural ni ha tenido una reacción alérgica en el pasado. En determinados casos, el individuo tiene antecedentes familiares de reacción alérgica, incluyendo antecedentes familiares de anafilaxia; en dichos casos, se puede saber o no si el individuo si el individuo va a tener una reacción alérgica, incluyendo anafilaxia.

El suministro de la composición de la invención puede realizarse por cualquier ruta adecuada, incluyendo sistémica o local, aunque en realizaciones específicas, la ruta de suministro es oral, intravenosa, tópica, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, bucal y así sucesivamente, por ejemplo.

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de la invención son útiles para prevenir y/o reducir el riesgo de o la gravedad de la anafilaxia y, en casos específicos, dicha acción se produce inhibiendo la actividad de Stat3 y/o Stat1. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de la invención son útiles para prevenir y/o reducir el riesgo de o la gravedad de la anafilaxia y, en casos específicos, dicha acción se produce inhibiendo o reduciendo la desgranulación de los mastocitos. En determinadas realizaciones, las composiciones inhiben Stat3, pero no inhiben Stat1. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención interactúan con el dominio SH2 de Stat3, inhiben competitivamente la unión de Stat3 recombinante a su ligando peptídico con pY inmovilizado y/o inhiben la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3, por ejemplo. En realizaciones particulares, las composiciones de la invención cumplen los criterios de análisis de interacción (CIA, por sus siglas en inglés): 1) puntuación de energía mínima global ≤ -30 ; 2) formación de un puente de sal y/o red de enlaces de H dentro del sitio de unión al resto pY de Stat3; y/o 3) formación de un enlace de H con o bloqueando el acceso al hidrógeno de la amida de E638 de Stat3, por ejemplo. En algunas realizaciones, la composición o las composiciones interactúan con un compartimento de unión hidrófoba con el dominio SH2 de Stat3. En algunas realizaciones, la composición o las composiciones inhiben la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico afín. En algunas realizaciones, la composición o las composiciones inhiben la fosforilación de Stat3 mediada por citocinas dentro de las células. En algunas realizaciones, la composición o las composiciones inhiben la translocación nuclear de Stat3 dentro de las células.

La invención proporciona una composición para su uso en un método para prevenir y/o reducir el riesgo o la gravedad de la anafilaxia en un individuo que comprende suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en N-(1',2'-dihidroxi-1,2'-binaftalen-4'-il)-4-metoxibencenosulfonamida (que puede denominarse Cpd 188-9), -N-(3,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxibencenosulfonamida, N-(4,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(5,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(6,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxibencenosulfonamida, N-(7,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(8,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, 4-Bromo-N-(1,6'-dihidroxi-[2,2'] binaftalenil-4-il)-bencenosulfonamida y una mezcla de los mismos.

La invención proporciona adicionalmente la composición anterior en donde dicho método comprende proporcionar la composición a dicho individuo en múltiples dosis, en donde preferentemente las dosis múltiples están separadas por minutos, horas, días o semanas.

En otra realización, la invención proporciona la composición anterior en donde en dicho método la composición se proporciona a dicho individuo antes de la exposición o después de la exposición a al menos un alérgeno que induce la anafilaxia.

En esta realización, la composición se proporciona preferentemente a dicho individuo al menos 0,25, 0,5, 0,75, 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23 o 24 horas; o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días; o al menos 1, 2, 3 o 4 semanas antes o después de la exposición a al menos un alérgeno que induce la anafilaxia.

En una realización preferida, dicho alérgeno es un alérgeno alimentario, en donde preferentemente el alérgeno alimentario es uno o más alérgenos alimentarios seleccionados del grupo que consiste en leche, legumbres, marisco,

frutos secos, huevos, pescado, soja y trigo.

En otra realización preferida, dicho alérgeno es un alérgeno ambiental o estacional, en donde preferentemente el alérgeno ambiental o el alérgeno estacional es polen o moho.

5 En una realización adicional preferida, el alérgeno es un alérgeno de veneno, en donde preferentemente el alérgeno de veneno es de un organismo seleccionado del grupo que consiste en avispa, abeja, hormiga, avispon, chaqueta amarilla y áspid.

10 En una realización preferida adicional, dicho alérgeno es un alérgeno de medicamento, en donde preferentemente el alérgeno de medicamento se selecciona del grupo que consiste en anestésicos, antibióticos de β -lactamas, aspirina, fármaco antiinflamatorio no esteroideo, quimioterapia, vacuna, preparaciones de protamina y de hierbas.

En otra realización preferida, el alérgeno es látex.

15 La invención proporciona además la composición anterior en donde dicho método comprende además la etapa de diagnosticar la anafilaxia.

20 También se describen, en el presente documento, métodos para tratar la anafilaxia en un individuo en donde la composición o composiciones son un inhibidor de cualquier miembro de la familia de proteínas STAT, incluyendo STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 (STAT5A y STAT5B) o STAT6, por ejemplo.

Descripción de los dibujos

25 La FIG. 1 demuestra la inhibición de la unión de Stat3 al ligando fosfopeptídico inmovilizado por los compuestos. La unión de Stat3 recombinante (500 nM) a un chip sensor de BiaCore recubierto con un fosfododecapéptido basado en la secuencia de aminoácidos que rodea a Y1068 dentro del EGFR se midió en tiempo real por SPR (Unidades de respuesta) en ausencia (0 μ M) o en presencia de concentraciones crecientes (0,1 a 1.000 μ M) de Cpd3 (panel A), Cpd30 (panel B), Cpd188 (panel C), Cpd3-2 (panel D), Cpd3-7 (panel E) y Cpd30-12 (panel F).
30 Los datos mostrados son representativos de 2 o más experimentos. Los niveles de equilibrio de unión obtenidos en ausencia o presencia de compuestos se normalizaron (respuesta obtenida en presencia del compuesto 4, la respuesta obtenida en ausencia del compuesto \times 100) y se representaron gráficamente frente al logaritmo de la concentración (nM) de los compuestos (panel G). Los puntos experimentales se ajustan a una curva de unión competitiva que utiliza una ecuación logística de cuatro parámetros (véase métodos ejemplares para más detalles).
35 Estas curvas se usaron para calcular la CI_{50} (Tabla 4).

La FIG. 2 demuestra la inhibición de la activación mediada por IL-6 de Stat3 por los compuestos. Las células HepG2 se trataron previamente con DMSO solo o con DMSO que contenía Cpd3 (panel A), Cpd188 (panel B), Cpd30 (panel C), Cpd3-2 (panel D), Cpd3-7 (panel E) o Cpd30-12 (panel F) a la concentración indicada durante 60 min. Las células se estimularon después con IL-6 (30 ng/ml) durante 30 minutos. Los extractos de proteínas de las células se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron y se desarrollaron en serie con anticuerpos contra pStat3, Stat3 total y β -actina. Las manchas se separan entre cada prueba de anticuerpos. Las intensidades de las bandas de inmunotransferencia se cuantificaron por densitometría. El valor de la intensidad de cada banda de pStat3 se dividió por cada valor correspondiente de la intensidad total de la banda de Stat3 y los resultados se normalizaron al valor de control tratado con DMSO y se representaron gráficamente en función del logaritmo de la concentración de los compuestos. Las curvas con mejor ajuste se generaron basándose en un Modelo Logístico de 4 Parámetros/Un Sitio de Dosis Respuesta/XLfit 4.2, IDBS. Cada panel es representativo de 3 o más experimentos.

50 La FIG. 3 proporciona las fórmulas químicas y los nombres de los compuestos. Las fórmulas químicas y los nombres están indicados para Cpd3 (panel A), Cpd30 (panel B), Cpd188 (panel C), Cpd3-2 (panel D), Cpd3-7 (panel E) y Cpd30-12 (panel F).

La FIG. 4 muestra el efecto de los compuestos sobre la activación de Stat1. Las células HepG2 se trataron previamente con DMSO solo o con DMSO que contenía cada uno de los compuestos a una concentración de 300 μ M durante 60 minutos. Las células se estimularon con IFN- γ (30 ng/ml) durante 30 min. Los extractos de proteínas de las células se separaron por SDS-PAGE y se inmunotransfirieron en serie con anticuerpos contra pStat1, Stat1 total y β -actina. Las manchas se separan entre cada inmunotransferencia. Los resultados mostrados son representativos de 2 o más experimentos.

60 La FIG. 5 proporciona comparaciones de las secuencias de los dominios SH2 de Stat3 y Stat1, de las estructuras 3-D y de las energías de van der Waals de la unión de los compuestos. La alineación de secuencias de los dominios SH2 de Stat3 y Stat1 se muestra en el panel A. Los restos que se unen al resto pY se resaltan y señalan con una flecha sólida, el resto (E638) que se une al resto +3 se resalta y señala por una flecha punteada y el Bucle $_{\beta C_{BD}}$ y el Bucle $_{\alpha B-\alpha C}$, que comprenden el sitio de unión hidrófoba consistente, se resaltan y señalan con flechas discontinuas punteadas y discontinuas, respectivamente. El panel B muestra una superposición de un modelo de superficie de van der Waals de tubo y niebla del dominio SH2 de Stat3 y un modelo de superficie de van der Waals

de tubo y niebla del SH2 de Stat1. Los restos del dominio SH2 de Stat3 que representan el Bucle β C- β D se resaltan y se muestran mediante círculos punteados y los restos que representan el Bucle α B- α C se resaltan y se muestran con un círculo discontinuo punteado; los restos de bucle correspondientes dentro del dominio SH2 de Stat1 se muestran en una niebla ligera que rodea los círculos. Esta superposición se muestra unida por Cpd3-7 ya que se uniría al dominio SH2 de Stat3. Se calculó la energía de van der Waals de cada compuesto unido al dominio SH2 de Stat1 o al dominio SH2 de Stat3, normalizada al valor de Stat1 y representado en el panel C.

La FIG. 6 muestra un modelo informático de cada compuesto unido por el dominio SH2 de Stat3. Los resultados del acoplamiento por ordenador al dominio SH2 de Stat3 se muestran para Cpd3 (panel A), Cpd30 (panel B), Cpd188 (panel C), Cpd3-2 (panel D), Cpd3-7 (panel E) y Cpd30-12 (panel F). La imagen a la izquierda de cada panel muestra la unión de los compuestos a un modelo de relleno espacial del dominio SH2 de Stat3. El sitio de unión al resto pY está representado por un círculo discontinuo, el sitio de unión al resto +3 está representado por un círculo sólido, el bucle Bucle β C- β D está representado por un círculo punteado y el bucle Bucle α B- α C está representado por un círculo discontinuo punteado. Los restos R609 y K591 críticos para la unión a pY se muestran dentro de un círculo discontinuo, el resto E638 que se une al resto +3 se muestra dentro de un círculo sólido y el sitio de unión hidrófoba que consiste en el Bucle β C- β D y en el Bucle α B- α C se muestra dentro de un círculo discontinuo punteado y un círculo punteado, respectivamente. La imagen en el lado derecho de cada panel es una vista más cercana de esta interacción con los enlaces de hidrógeno indicados por líneas punteadas. En la FIG. 6A, el resto de ácido benzoico cargado negativamente de Cpd3 tiene interacciones electrostáticas con el sitio de unión al resto pY con carga positiva que consiste principalmente en el grupo catión guanidinio de R609 y el grupo amonio básico de K591. El grupo ácido benzoico también forma una red de enlaces de hidrógeno que consiste en dobles enlaces de H entre el oxígeno carboxílico y el hidrógeno de amonio de R609 y el hidrógeno de la amida de E612. La formación de enlaces de H también se produce entre el oxígeno del carbonilo del ácido benzoico y el hidrógeno hidroxílico de la cadena lateral de la Serina 611. Dentro del sitio de unión al resto +3, el átomo de oxígeno de 1,4-benzodioxina forma un enlace de hidrógeno con el hidrógeno de la amida de E638. Además, la 2,3-dihidro-1,4-benzodioxina de Cpd3 interactúa con los bucles que forman el sitio de unión hidrófoba. En la FIG. 6B, el extremo carboxílico del resto de ácido benzoico de Cpd30, que está cargado negativamente en condiciones fisiológicas, forma un puente de sal con el grupo guanidinio de R609 dentro del sitio de unión al resto pY. Dentro del sitio de unión al resto +3, el oxígeno del grupo tiazolidina forma un enlace de H con el hidrógeno de la amida de la cadena principal peptídica de E638. Además, el resto de tiazolidina se hunde en el sitio de unión hidrófoba. En la FIG. 6C existe una interacción electrostática entre el resto (carboximetil) tio de Cpd188 que lleva una carga negativa y el sitio de unión al resto pY que consiste en R609 y K591 que llevan carga positiva en condiciones fisiológicas. Existen enlaces de H entre el oxígeno del hidroxilo del grupo (carboximetil) tio de Cpd188 y el hidrógeno del guanidinio de R609, entre el oxígeno del hidroxilo del grupo (carboximetil) tio y el hidrógeno de la amida de la cadena principal de E612 y entre el oxígeno del carboxilo del grupo (carboximetil) tio de Cpd188 y el hidrógeno del hidroxilo de S611. Dentro del sitio de unión al resto +3, existe un enlace de H entre el oxígeno del hidroxilo del grupo del ácido benzoico de Cpd188 y el hidrógeno de la amida de E638. Además, el grupo ácido benzoico se extiende e interactúa con el sitio de unión hidrófoba. En la FIG. 6D, el grupo ácido benzoico de Cpd3-2 tiene interacciones electrostáticas significativas con el compartimento del sitio de unión al resto pY, aportado principalmente por R609 y K591 y forma dos enlaces de H; el oxígeno carboxílico del grupo ácido benzoico se une al hidrógeno de guanidinio de R609 y el oxígeno del carbonilo del grupo ácido benzoico se une al hidrógeno del carbonilo de S611. Dentro del sitio de unión al resto +3, el oxígeno dentro del grupo 1,3-dihidro-2H-inden-2-ilideno forma un enlace de H con el hidrógeno de la amida de la cadena principal de E638. Además, el grupo 1,3-dihidro-2H-inden-2-ilideno se hunde en el sitio de unión hidrófoba. En la FIG. 6E, los enlaces de H se forman entre el oxígeno del carbonilo del resto 4-benzoato de metilo de Cpd 3-7 y el guanidinio de la cadena lateral de R609 y entre el oxígeno del metoxi y el hidrógeno del extremo de amonio de K591. El grupo (2-metoxi-2-oxoetil)-4,8-dimetil-2-oxo-2H-cromeno de Cpd3-7 bloquea el acceso al hidrógeno de la amida de E638 dentro del sitio de unión al resto +3. Además, Este grupo se hunde en el sitio de unión hidrófoba. En la FIG. 6F existen interacciones electrostáticas entre el grupo derivado del ácido benzoico de Cpd30-12 y R609 y 591 dentro del sitio de unión al resto pY. Además, los enlaces de H se forman entre el oxígeno del hidroxilo de Cpd30-12 y el hidrógeno del guanidinio de R609, entre el oxígeno del carboxilo de Cpd30-12 y el hidrógeno del hidroxilo de S611 y entre el grupo furilo de Cpd30-12 y el hidrógeno de amonio de K591. Los grupos 1,3-dietil-4, 6-dioxo-2-tioxotetrahidro-5(2H)-pirimidinilideno bloquean el acceso al sitio de unión del resto +3; sin embargo, se extiende hacia el surco entre el sitio de unión al resto pY y el Bucle β C- β D, mientras se evita el sitio de unión hidrófoba.

La FIG. 7 muestra la inhibición de la translocación citoplasmática a nuclear de Stat3 evaluada por microscopía de fluorescencia confocal y de alto rendimiento. En el panel A, las células MEF/GFP-Stat3 cultivadas en cubreobjetos se trataron previamente con DMSO que contenía (fila cuatro) o no contenía (fila tres) Cpd3 (300 μ M) durante 60 minutos antes de estimularse sin (fila uno) o con IL-6 (200 ng/ml) e IL-6sR (250 ng/ml) durante 30 minutos (filas dos, tres y cuatro). Los cubreobjetos se examinaron mediante microscopía fluorescente confocal utilizando filtros para detectar GFP (columna uno), DAPI (columna dos) o ambos (unión; columna tres). En el panel B, las células MEF-GFP-Stat3 se cultivaron en placas de 96 pocillos con fondos de vidrio óptico y se trataron previamente con el compuesto indicado a las concentraciones indicadas por cuadruplicado durante 1 hora y después se estimularon con IL-6 (200 ng/ml) e IL-6sR (250 ng/ml) durante 30 minutos. Se fijaron las células y se examinaron las placas mediante microscopía de alto rendimiento para determinar la intensidad de fluorescencia en el núcleo (FLIN, por sus siglas en inglés) y se calculó el % de Δ FLIN_{Máx} como se describe en el Ejemplo 1. Los datos mostrados son la

media \pm DE y son representativos de 2 o más estudios. Las curvas con mejor ajuste se generaron basándose en un Modelo Logístico de 4 Parámetros/Un Sitio de Dosis Respuesta/XLfit 4.2, IDBS y se usaron para calcular la CI_{50} (Tabla 1).

5 La FIG. 8 demuestra la inhibición de la unión al ADN de Stat3 por los compuestos. Los ensayos de cambio de movilidad electroforética se realizaron usando extractos de células enteras preparados a partir de células HepG2 sin y con estimulación con IL-6 (30 ng/ml) durante 30 minutos. La proteína (20 μ g) se incubó con oligonucleótido de doble hélice radiomarcado (hSIE) y DMSO sin o con los compuestos indicados (300 μ M) durante 60 minutos a 10 37 °C y después se separó por PAGE. El gel se secó y se autorradiografió; se muestra la porción del gel correspondiente a la banda de hSIE unido a Stat3. Los datos mostrados son representativos de 2 estudios.

La FIG. 9 muestra Cpd3, Cpd30 y Cpd188 y la hidrofobicidad o hidrofiliidad de la superficie de la molécula. Las flechas discontinuas apuntan a superficies hidrófilas y las flechas sólidas apuntan a superficies hidrófobas.

15 La FIG. 10 ilustra el compuesto de referencia 3 (Cpd3). La imagen superior izquierda de la FIG. 11 muestra Cpd3 acoplado a Stat3 y la interacción entre Cpd3 y la superficie de la proteína y derivados de Cpd3 que pueden encajar en la superficie de la proteína. Las estrellas representan átomos y grupos químicos que pueden reemplazarse con otros átomos o grupos químicos para crear uno o más derivados funcionales. Las superficies hidrófobas/hidrófilas de Cpd3 también se muestran en la imagen superior derecha. Las flechas discontinuas apuntan a superficies hidrófilas y las flechas sólidas apuntan a superficies hidrófobas. R_1 y R_2 podrían ser idénticos o diferentes y pueden comprender hidrógeno, carbono, azufre, nitrógeno, oxígeno, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcanos, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alquenos, alquinos, derivados basados en alquinos, cetonas, derivados basados en cetonas, aldehídos, derivados basados en aldehídos, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácidos carboxílicos, éteres, derivados basados en éteres, ésteres y derivados basados en ésteres, 20 aminas, derivados basados en aminas, amidas, derivados basados en amidas, arenos monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en arenos, derivados basados en heteroarenos, fenoles, derivados basados en fenoles, ácido benzoico o derivados basados en ácido benzoico.

30 La FIG. 11 ilustra el compuesto de referencia 30 (Cpd30). La imagen superior izquierda de la FIG. 12 muestra Cpd30 acoplado a Stat3 y la interacción entre Cpd30 y la superficie de la proteína y derivados de Cpd30 que encajan en la superficie de la proteína. Las estrellas representan átomos y grupos químicos que pueden reemplazarse con otros átomos o grupos químicos para crear uno o más derivados funcionales. Las superficies hidrófobas/hidrófilas de Cpd30 también se muestran en la imagen superior derecha. Las flechas discontinuas apuntan a superficies hidrófilas y las flechas sólidas apuntan a superficies hidrófobas. La estructura 2-D de Cpd30 se muestra en la imagen inferior, R_1 , R_2 , R_3 y R_4 podrían ser idénticos o diferentes y pueden comprender ser hidrógeno, carbono, azufre, nitrógeno, oxígeno, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcanos, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alquenos, alquinos, derivados basados en alquinos, cetonas, derivados basados en cetonas, aldehídos, derivados basados en aldehídos, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácidos carboxílicos, éteres, derivados basados en éteres, ésteres y derivados basados en ésteres, aminas, derivados basados en aminas, amidas, derivados basados en amidas, arenos monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en arenos, derivados basados en heteroarenos, fenoles, derivados basados en fenoles, ácido benzoico, o derivados basados en ácido benzoico.

45 La FIG. 12 ilustra el compuesto de referencia 188 (Cpd188). La imagen superior izquierda de la FIG. 12 muestra Cpd188 acoplado a Stat3 SH2 y la interacción entre Cpd188 y la superficie de la proteína y derivados de Cpd188 que encajan en la superficie de la proteína. Las estrellas representan átomos y grupos químicos que pueden reemplazarse con otros átomos o grupos químicos para crear uno o más derivados funcionales. Las superficies hidrófobas/hidrófilas de Cpd188 también se muestran en la imagen izquierda en la parte inferior. Las flechas discontinuas apuntan a superficies hidrófilas y las flechas sólidas apuntan a superficies hidrófobas. En la imagen inferior derecha, R_1 y R_2 podrían ser idénticos o diferentes y pueden comprender hidrógeno, carbono, azufre, nitrógeno, oxígeno, alcanos, alcanos cíclicos, derivados basados en alcanos, alquenos, alquenos cíclicos, derivados basados en alquenos, alquinos, derivados basados en alquinos, cetonas, derivados basados en cetonas, aldehídos, derivados basados en aldehídos, ácidos carboxílicos, derivados basados en ácidos carboxílicos, éteres, derivados basados en éteres, ésteres y derivados basados en ésteres, aminas, derivados basados en aminas, amidas, derivados basados en amidas, arenos monocíclico o policíclico, heteroarenos, derivados basados en arenos, derivados basados en heteroarenos, fenoles, derivados basados en fenoles, ácido benzoico o derivados basados en ácido benzoico.

60 La FIG. 13 ilustra diagramas esquemáticos de Stat1 y Stat3.

La FIG. 14 demuestra que la CI_{50} de SPR de las sondas químicas de Stat3 de 2ª generación está inversamente correlacionada con la puntuación del farmacóforo 3-D.

65 La FIG. 15. muestra la CI_{50} de SPR y la CE_{50} de la apoptosis de AML del Cpd188 precursor y dos sondas químicas de Stat3 de tipo 188 de 2ª generación.

La FIG. 16 proporciona una ilustración de las relaciones estructura-actividad de 38 sondas de Stat3 de tipo Cpd188 de 2ª generación.

La FIG. 17 muestra un esquema de modificación ejemplar para el desarrollo de la sonda de Stat3 de 3ª generación usando Cpd188-15 como armazón.

La FIG. 18 proporciona una ilustración de la superficie electrostática del dominio SH2 de Stat3 (área positiva en azul, neutral en blanco y negativa en rojo en una FIG. a color) y 20 posiciones de acoplamiento de 5 ($R = CH_2PO_3^{2-}$), mostrando fuertes interacciones entre los grupos fosfonato (en morado y rojo) y K591/R609.

La FIG. 19A muestra las alergias alimentarias diagnosticadas por un médico en voluntarios sanos, AD-HIES y los pacientes control atópicos se determinaron mediante entrevista. La FIG. 19B demuestra la incidencia de anafilaxia diagnosticada por un médico en pacientes con AD-HIES y control atópicos. Significación determinada por una prueba de Chi-cuadrado de dos colas.

La FIG. 20A muestra que la desgranulación de mastocitos se midió mediante sobrecruzamiento de FcεRI y posterior liberación de β-hexosaminidasa en células LAD2 transducidas con cinco ARNhc diferentes contra STAT3. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. LAD2 = control no estimulado, LAD+ = sobrecruzamiento de FcεRI. La FIG. 20B muestra que la desgranulación de mastocitos se midió mediante sobrecruzamiento de FcεRI y posterior liberación de β-hexosaminidasa en mastocitos humanos primarios transducidos con dos ARNhc diferentes contra STAT3. HuMC = control no estimulado, HuMC+ = sobrecruzamiento de FcεRI.

La FIG. 21 demuestra la correlación entre la atenuación génica de STAT23 y la inhibición de la desgranulación de mastocitos ($r^2 = 0,9463$).

La FIG. 22 demuestra un tratamiento eficaz en un modelo de anafilaxia usando Cpd188-9.

La FIG. 23 proporciona una curva de respuesta a la dosis utilizando diferentes dosis de Cpd188-9 en un modelo de anafilaxia que utiliza beta-hexosaminidasa (% de liberación) como una medida de la desgranulación de los mastocitos.

La FIG. 24 muestra que se evitó la anafilaxia sistémica *in vivo* con un inhibidor de STAT3 ejemplar.

La FIG. 25 demuestra que la filtración vascular periférica y central disminuye por Cpd 188-9.

La FIG. 26 ilustra que el efecto de Cpd188-9 no se debe a una disminución de la desgranulación de los mastocitos *in vivo*.

La FIG. 27 demuestra el efecto de Cpd 188-9 en la desgranulación inducida por Ag en mastocitos murinos.

La FIG. 28 ilustra un ensayo de permeabilidad transwell ejemplar.

La FIG. 29 muestra que HUVECS tratadas previamente con Cpd188-9 (como ejemplo, durante 7 días) resisten a la permeabilidad inducida por histamina.

La FIG. 30 muestra que el ratón HIES es resistente a la anafilaxia (Siegel *et al.*, JACI, 2013).

La FIG. 31 demuestra HUVECS mutantes para STAT3 (HIES6) resisten a la permeabilidad inducida por histamina.

Descripción detallada de la invención

En algunas realizaciones, existe una composición para su uso en un método para prevenir y/o reducir el riesgo o la gravedad de la anafilaxia en un individuo, que comprende suministrar al individuo uno o más compuestos particulares.

En algunas realizaciones, el o los compuestos son un inhibidor de STAT3. En casos particulares, el o los compuestos son un inhibidor de STAT1, pero en casos particulares no es un inhibidor de STAT1. En determinados aspectos, existen algunos compuestos que son inhibidores tanto de STAT3 como de STAT1 o bien no son inhibidores de STAT3 ni de STAT1. En algunos casos, la composición es un inhibidor de mastocitos, incluyendo un inhibidor de la desgranulación de mastocitos.

La invención proporciona un compuesto para su uso en la prevención y/o reducción del riesgo o la gravedad de la anafilaxia, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en N-(1',2'-dihidroxi-1,2'-binaftalenil-4'-il)-4-metoxibencenosulfonamida, N-(3,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(4,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(5,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(6,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(7,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(8,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-

bencenosulfonamida, 4-Bromo-N-(1,6'-dihidroxi-[2,2']binaftalenil-4-il)-bencenosulfonamida o una combinación de los mismos y una mezcla de los mismos.

5 En una realización específica de la invención, la composición es un inhibidor de Stat3, pero no inhibe Stat1. La composición puede ser un inhibidor de la desgranulación de los mastocitos.

10 En una realización específica de la invención, la composición se suministra *in vivo* en un mamífero. En otra realización el mamífero es un ser humano. En otra realización específica, se sabe que el ser humano tiene anafilaxia, se sospecha que tiene anafilaxia o está en riesgo de desarrollar anafilaxia. En otra realización, se sabe que el ser humano tiene anafilaxia y está recibiendo una terapia adicional para la anafilaxia. La composición o las composiciones de la divulgación previenen y/o reducen el riesgo o la gravedad de la anafilaxia.

I. Definiciones

15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "un" o "uno/una" puede significar uno/una o más. Como se usa en la reivindicación o en las reivindicaciones, en el presente documento, cuando se usan junto con la expresión "que comprende", las palabras "un" o "uno/una" pueden significar uno/a o más de uno/a. Tal como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más. Más aún, las expresiones "que tiene", "que incluye", "que contiene" y "que comprende" se usan indistintamente y un experto en la materia es consciente de que estos
20 términos son términos abiertos. Algunas realizaciones de la invención pueden consistir o consisten esencialmente en uno o más elementos, etapas del método y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición descritos en el presente documento pueden implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento.

25 El término "inhibidor" como se usa en el presente documento se refiere a una o más moléculas que interfieren al menos en parte con la actividad de Stat3 para realizar una o más actividades, incluyendo la capacidad de Stat3 para unirse a una molécula y/o la capacidad de ser fosforilada. En realizaciones alternativas, un inhibidor reduce el nivel de desgranulación de los mastocitos, que puede medirse *in vitro* por el % de liberación de beta-hexosaminidasa u otros mediadores de mastocitos como las citocinas, histamina, leucotrienos, etc. Se puede medir el nivel de desgranulación
30 de los mastocitos *in vivo* en una multitud de modelos de alergia y de anafilaxia que miden principalmente la reducción de la temperatura central con pruebas de provocación a corto plazo, permeabilidad vascular, inflamación o mediadores sistémicos de mastocitos, tal como la histamina o la triptasa.

35 La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento significa esa cantidad de un compuesto, material o composición que comprende un compuesto de la presente invención que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, *p. ej.*, tratar (es decir, prevenir y/o mejorar) la anafilaxia en un sujeto o inhibir las interacciones proteína-proteína mediadas por un dominio SH2 en un sujeto, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicada a cualquier tratamiento médico. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para reducir o eliminar al menos un síntoma. Un experto en la materia reconoce que una cantidad puede
40 considerarse terapéuticamente eficaz incluso si la anafilaxia no se erradica totalmente, sino que se mejora parcialmente. Por ejemplo, un síntoma de la anafilaxia puede reducirse parcialmente o eliminarse por completo y así sucesivamente.

45 La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable.

50 La frase "en riesgo de tener una reacción alérgica" como se usa en el presente documento se refiere a un individuo que ha tenido una reacción alérgica antes, tiene uno o más miembros de la familia con antecedentes de reacciones alérgicas o es un niño.

55 Como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de una interacción entre dos entidades, tal como una interacción proteína-proteína. La afinidad de unión a veces se denomina K_a , o constante de asociación, que describe la probabilidad de que las dos entidades separadas estén en el estado unido. En general, la constante de asociación se determina mediante una variedad de métodos en los que dos entidades separadas se mezclan entre sí, la porción no unida se separa de la porción unida y se miden las concentraciones de no unidas y unidas. Un experto en la materia se da cuenta de que existe una variedad de métodos para medir constantes de asociación. Por ejemplo, las porciones no unidas y unidas pueden separarse entre sí mediante adsorción, precipitación, filtración en gel, diálisis o centrifugación, por ejemplo. La medición de las concentraciones de porciones unidas y no unidas se puede lograr, por ejemplo, midiendo la radiactividad o fluorescencia, por ejemplo. La K_a también se puede inferir indirectamente a través de la determinación de la K_i o constante inhibidora. La determinación de la K_i puede hacerse de varias maneras, por ejemplo, midiendo la K_a de la unión de STAT3 a su ligando fosfopeptídico dentro del EGFR en la posición Y1068 y midiendo la concentración de una molécula que reduce la unión de STAT3
60 en un 50 %. En determinadas realizaciones de la invención, la afinidad de unión de un inhibidor de Stat3 por el dominio SH2 de Stat3 es similar o mayor que la afinidad de los compuestos enumerados en el presente documento.

El término "dominio" como se usa en el presente documento se refiere a una subsección de un polipéptido que posee una característica estructural y/o funcional exclusiva; generalmente, esta característica es similar a través de diversos polipéptidos. La subsección generalmente comprende aminoácidos contiguos, aunque también puede comprender aminoácidos que actúan en conjunto o que están muy cerca debido al plegamiento u otras configuraciones. Un ejemplo de un dominio de proteína es el dominio de homología Src 2 (SH2) de Stat3. El término "dominio SH2" está reconocido en la técnica y, como se usa en el presente documento, se refiere a un dominio de proteína implicado en interacciones proteína-proteína, tal como un dominio dentro de la tirosina cinasa Src que regula la actividad cinasa. La invención contempla la modulación de la actividad, tal como la actividad que depende de las interacciones proteína-proteína, mediada por dominios SH2 de proteínas (por ejemplo, tirosina cinasas como Src) o proteínas implicadas en la transmisión de una señal de tirosina cinasa en organismos que incluyen mamíferos, tal como seres humanos.

Como se usa en el presente documento, un "mamífero" es un sujeto apropiado para el método de la presente invención. Un mamífero puede ser cualquier miembro de la clase superior de vertebrados Mammalia, incluyendo a los seres humanos; caracterizados por el nacimiento vivo, vello corporal y glándulas mamarias en la hembra que segregan leche para alimentar a las crías. Adicionalmente, los mamíferos se caracterizan por su capacidad para mantener una temperatura corporal constante a pesar de las condiciones climáticas cambiantes. Ejemplos de mamíferos son los seres humanos, gatos, perros, vacas, ratones, ratas y chimpancés. Los mamíferos pueden denominarse "pacientes" o "sujetos" o "individuos".

II. Realizaciones Generales

Las realizaciones generales incluyen una o más composiciones para la prevención de la anafilaxia. Un individuo que necesita prevención de la anafilaxia, incluida la reducción de la gravedad de al menos un síntoma de la anafilaxia, recibe una cantidad eficaz de una o más composiciones como se describe en el presente documento. Aunque cualquier composición divulgada en el presente documento puede ser adecuada, en realizaciones específicas, la composición es N-(1',2'-dihidroxi-1,2'-binaftalen-4'-il)-4-metoxibencenosulfonamida (Cpd 188-9).

En algunos casos, un individuo previene la anafilaxia o reduce la gravedad de la anafilaxia con una o más composiciones tal como se divulga en el presente documento al ingerir la composición de forma rutinaria, tal como de forma rutinaria después de tener una primera anafilaxia o después de identificar el riesgo de tener anafilaxia (por ejemplo, tal como mediante una prueba de alergia convencional). La expresión "de forma rutinaria" puede describirse como un curso normal del procedimiento, como una o más de una vez al día, quincenalmente, semanalmente, mensualmente y así sucesivamente, por ejemplo.

En algunos casos, un individuo previene la anafilaxia o reduce la gravedad de la anafilaxia con una o más composiciones tal como se divulga en el presente documento al ingerir la composición de forma periódica, tal como de forma periódica después de tener una primera anafilaxia o después de identificar el riesgo de tener anafilaxia (por ejemplo, tal como mediante una prueba de alergia convencional). El período puede ser una o más estaciones del año. El período puede ser uno o más períodos de tiempo para uno o más alérgenos aumentados en un entorno, tal como durante la polinización de uno o más tipos de plantas, por ejemplo.

En algunos casos, un individuo previene la anafilaxia o reduce la gravedad de la anafilaxia con una o más composiciones tal como se divulga en el presente documento al ingerir la composición antes de un evento o entorno o condición en donde el individuo probablemente esté o se sepa que está expuesto al alérgeno. Por ejemplo, al individuo se le puede administrar la composición antes del consumo de un alérgeno alimentario particular, antes de la proximidad o exposición a un alérgeno vegetal particular, antes de la exposición a un ambiente con insectos que pican, antes de una exposición al látex, antes de las relaciones sexuales y así sucesivamente.

En algunos casos, un individuo puede ingerir la composición de manera rutinaria, pero puede tomar una dosis mayor de la composición antes de un evento o entorno o condición en donde el individuo es probable que esté o se sepa que está expuesto al alérgeno.

En algunos casos, un individuo puede ingerir la composición de manera periódica, pero puede tomar una dosis mayor de la composición antes de un evento o entorno o condición en donde el individuo es probable que esté o se sepa que está expuesto al alérgeno.

En determinados casos, un individuo está recibiendo, ha recibido y/o recibirá una dosis eficaz de una o más composiciones de la divulgación, pero el individuo también recibirá otra composición médica para la anafilaxia. En algunos casos, la otra composición médica puede ser una o más dosis de un antihistamínico, epinefrina, esteroides o una combinación de los mismos, por ejemplo.

En los casos en que un individuo tiene al menos un síntoma de anafilaxia, el individuo puede recibir una cantidad eficaz de una o más composiciones de la invención antes y/o después de la aparición de anafilaxia. Cuando se proporciona al individuo una o más composiciones antes de la aparición de la anafilaxia, el inicio de la anafilaxia puede retrasarse o inhibirse por completo y/o la gravedad de la anafilaxia puede reducirse, en comparación con la afección

del individuo sin haber recibido la composición o las composiciones, por ejemplo.

En realizaciones particulares, se ha diagnosticado a un individuo con una reacción alérgica. Un individuo puede someterse a prueba de reacción alérgica por medios convencionales en la técnica. Por ejemplo, uno puede realizar pruebas cutáneas (donde se coloca una pequeña cantidad de un posible alérgeno sobre o debajo de la piel para ver si se desarrolla una reacción) y/o pruebas de sangre para detectar anticuerpos contra el alérgeno, tal como el uso de ELISA para medir IgE. Dicha prueba se puede realizar antes o después de saber que el individuo tiene una o más alergias o que ha tenido una reacción alérgica.

10 III. Reacción Alérgica

Las realizaciones de la invención se refieren a composiciones para el tratamiento y/o prevención o reducción del riesgo de una reacción alérgica de anafilaxia. Una reacción alérgica es un trastorno de hipersensibilidad del sistema inmunitario en el que el sistema inmunitario de una persona reacciona a una sustancia normalmente inofensiva (un alérgeno), tal como del entorno. Las reacciones alérgicas se caracterizan por la activación excesiva de mastocitos y basófilos por la inmunoglobulina E (IgE) y la reacción da como resultado una respuesta inflamatoria con un intervalo desde incomodidad a ser fatal.

En la invención, la reacción alérgica es anafilaxia, que se caracteriza por un inicio rápido y puede ser fatal. Por lo general, causa una serie de síntomas que incluyen una erupción cutánea con picazón, hinchazón de la garganta y presión arterial baja, por ejemplo. Las causas comunes incluyen mordeduras/picaduras de insectos, alimentos y medicamentos.

A nivel fisiopatológico, la anafilaxia está causada por la liberación de mediadores a partir de los mastocitos, tal como por la liberación de mediadores inflamatorios y citocinas a partir de mastocitos y basófilos, generalmente debido a una reacción inmunitaria, pero a veces por un mecanismo no inmunitario. En el mecanismo inmunitario, la inmunoglobulina E (IgE) se une al antígeno (el material extraño que provoca la reacción alérgica). La IgE unida al antígeno activa los receptores FcεRI en los mastocitos y basófilos. Esto conduce a la liberación de mediadores inflamatorios como la histamina. Estos mediadores aumentan posteriormente la contracción de los músculos lisos bronquiales, desencadenan la vasodilatación, aumentan la filtración de líquido de los vasos sanguíneos y causan depresión del músculo cardíaco. Los mecanismos no inmunitarios implican sustancias que causan directamente la desgranulación de los mastocitos y basófilos.

La anafilaxia generalmente se presenta con muchos síntomas diferentes durante minutos u horas. Las áreas afectadas más comunes incluyen la piel, el sistema respiratorio, el sistema gastrointestinal, el corazón y la vasculatura y sistema nervioso central y con frecuencia incluyen más de un sistema u órgano.

Los síntomas de la piel generalmente incluyen urticaria generalizada, picazón, enrojecimiento y/o hinchazón de los tejidos afectados. La lengua puede hincharse y algunos experimentan secreción nasal e hinchazón de la conjuntiva. La piel también puede estar teñida de azul debido a la reducción de oxígeno. Los síntomas respiratorios incluyen dificultad para respirar, sibilancias o estridor, ronquera, dolor al tragar y/o tos. Los síntomas cardíacos incluyen espasmo de la arteria coronaria, infarto de miocardio, disritmia, paro cardíaco, cambios en la frecuencia cardíaca y/o una caída en la presión arterial o choque. Los síntomas gastrointestinales pueden incluir dolor abdominal tipo calambre, diarrea, vómitos, confusión, una pérdida de control de la vejiga y/o dolor pélvico similar al de los calambres uterinos.

La anafilaxia se puede diagnosticar basándose en criterios clínicos, tal como cuando dentro de unos minutos u horas de exposición a un alérgeno existe implicación de la piel o el tejido de la mucosa además de dificultad respiratoria o presión arterial baja. En determinados casos, la anafilaxia se diagnostica con dos o más de los siguientes síntomas: a. implicación de la piel o mucosa; b. dificultades respiratorias; c. presión arterial baja; y d. síntomas gastrointestinales. Pue estar implicada la presión arterial baja después de la exposición a un alérgeno conocido. El diagnóstico puede incluir pruebas de sangre para determinar triptasa o histamina (liberada de los mastocitos) para determinar la anafilaxia debido a picaduras de insectos o medicamentos.

Existen tres clasificaciones principales de anafilaxia, la totalidad de ellas puede prevenirse o reducirse en gravedad con una o más composiciones como se divulga en el presente documento: choque anafiláctico; anafilaxia bifásica; y pseudoanafilaxia o reacciones anafilactoides (que son un tipo de anafilaxia que no implica una reacción alérgica pero que se debe a la desgranulación directa de los mastocitos y puede denominarse anafilaxia no inmunitaria).

En determinadas realizaciones, un individuo que lo necesite recibe una o más composiciones como se divulga en el presente documento, pero también se expone a desensibilización.

Los individuos con alergias alimentarias son adecuados para la exposición a una o más composiciones como se divulga en el presente documento. Los alérgenos alimentarios habituales incluyen leche, legumbres (tal como cacahuetes), marisco, frutos secos, huevos, pescado, soja y trigo, por ejemplo. Los casos graves generalmente son causados por la ingestión del alérgeno, pero algunas personas experimentan una reacción grave al contacto y/o

proximidad cercana.

Los individuos con alergias a medicamentos son adecuados para la exposición a una o más composiciones como se divulga en el presente documento. Cualquier medicamento puede desencadenar potencialmente una reacción alérgica, incluyendo anestésicos, antibióticos de β -lactamas, aspirina, AINE, quimioterapia, vacunas, preparaciones de protamina y de hierbas. Algunos medicamentos (tal como la vancomicina, morfina o contraste de rayos X) causan anafilaxia al desencadenar directamente la desgranulación de los mastocitos.

Los individuos con alergias a veneno son adecuados para la exposición a una o más composiciones como se divulga en el presente documento. El veneno de animales que pican o muerden (tal como himenópteros (abejas y avispas), medusa, pastinaca) puede inducir anafilaxia en personas susceptibles. Los individuos con reacciones sistémicas previas (algo más que una reacción local alrededor del sitio de la picadura) corren el riesgo de una anafilaxia futura, aunque algunos individuos no han tenido reacción sistémica previa.

En algunos casos, los individuos que han tenido un tipo de reacción alérgica también son susceptibles de tener otro tipo de reacción alérgica y estos individuos pueden recibir cantidades eficaces de una o más composiciones como se divulga en el presente documento.

Los síntomas de reacción alérgica pueden desarrollarse rápidamente, con frecuencia en segundos o minutos. Pueden incluir lo siguiente: dolor abdominal; sonidos de respiración anormales (agudos); ansiedad; molestias u opresión en el pecho; tos; diarrea; dificultad para respirar; dificultad para tragar; mareos o aturdimiento; habones; picor; congestión nasal; náuseas o vómitos; palpitaciones; enrojecimiento de la piel; dificultad para hablar; hinchazón de la cara, ojos o lengua; inconsciencia; sibilancia; pulso rápido, arritmia; edema pulmonar; baja presión arterial; piel azul; debilidad; y/o sibilancias.

La patente de Estados Unidos N.º 8.099.167 describe métodos y dispositivos para tratar la anafilaxia, choque anafiláctico, constricción bronquial y/o asma.

IV. Composiciones

Las realizaciones de la invención abarcan composiciones que son útiles para prevenir y/o reducir el riesgo o la gravedad de la anafilaxia. Las composiciones específicas se divulgan en el presente documento.

En realizaciones particulares, las composiciones como se describen en el presente documento se utilizan en el tratamiento y/o prevención de la anafilaxia.

La invención proporciona un método para prevenir o reducir el riesgo o la gravedad de la anafilaxia en un individuo que comprende suministrar al individuo un compuesto seleccionado del grupo que consiste en N-(1',2'-dihidroxi-1,2'-binaftalen-4'-il)-4-metoxibencenosulfonamida, N-(3,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(4,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(5,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(6,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(7,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(8,T-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, 4-Bromo-N-(1,6'-dihidroxi-[2,2'] binaftalenil-4-il)-bencenosulfonamida y una mezcla de los mismos.

Las composiciones de la presente invención pueden obtenerse por cualquier medio adecuado. En realizaciones específicas, los derivados de la invención se proporcionan comercialmente, aunque en realizaciones alternativas los derivados se sintetizan. La síntesis química de los derivados puede emplear técnicas bien conocidas a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Dichas transformaciones sintéticas pueden incluir, pero sin limitación, protección, desprotección, oxidación, reducción, acoplamiento cruzado C-C catalizado por metal, etapas de acoplamiento Heck o de acoplamiento Suzuki (véase, por ejemplo, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structures, 5ta edición John Wiley and Sons de Michael B. Smith y Jerry March).

V. Realizaciones para direccionamiento a Stat3

Las proteínas STAT, de las cuales existen siete (1,2, 3, 4, 5A, 5B y 6), transmiten señales de hormonas peptídicas desde la superficie celular al núcleo. La información estructural detallada de las proteínas STAT actualmente está limitada a Stat1 y Stat3. Stat1 fue la primera STAT que se descubrió (Fu *et al.* 1992) y se requiere para la señalización de los IFN Tipo I y II (Meraz *et al.* 1996; Wiederkehr-Adam *et al.* 2003; Durbin *et al.*, 1996; Haan *et al.*, 1999). Los estudios en ratones deficientes en Stat1 (Meraz *et al.* 1996; Durbin *et al.*, 1996; Ryan *et al.* 1998) apoyan un papel esencial para Stat1 en la inmunidad innata, especialmente contra patógenos víricos. Además, Stat1 es un potente inhibidor del crecimiento y promotor de la apoptosis (Bromberg y Darnell, 2000). Además, debido a que los tumores de animales de tipo silvestre tratados con carcinógeno crecen más rápidamente cuando se trasplantan en animales deficientes en Stat1 que en un hospedador de tipo silvestre, Stat1 contribuye a la vigilancia del tumor (Kaplan *et al.* 1998).

Stat3 se denominó originalmente factor de respuesta de fase aguda (APRF, por sus siglas en inglés) porque se identificó por primera vez como un factor de transcripción que se unía a elementos de respuesta a IL-6 dentro de la región potenciadora-promotora de diferentes genes de proteínas de fase aguda (Akira, 1997). Además de los receptores para la familia de las citocinas IL-6, otras vías de señalización están vinculadas a la activación de Stat3
 5 incluyen receptores para otros receptores de citocinas de tipo I y tipo II, receptor tirosina cinasas, receptores acoplados a proteínas G y cinasas Src (Schindler y Darnell, 1995; Turkson *et al.*, 1998). La alteración dirigida del gen Stat3 de ratón conduce a la letalidad embrionaria a los 6,5 a 7,5 días (Takeda *et al.* 1997) indicando que Stat3 es esencial para el desarrollo embrionario temprano, posiblemente gastrulación o función del endodermo visceral (Akira, 2000). La eliminación de Stat3 específica de tejidos usando la tecnología Cre-lox ha revelado una disminución de la apoptosis
 10 de las células epiteliales mamarias que da como resultado una involución mamaria retrasada durante el destete (Chapman *et al.* 1999). Hallazgos recientes indican que el cambio de la proteína STAT predominante activada por un receptor dado puede producirse cuando se elimina genéticamente una STAT cadena abajo de ese receptor (Costa-Pereira *et al.*, 2002; Qing y Stark, 2004). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que el efecto de la eliminación de Stat3 en el tejido mamario pueda estar mediado indirectamente por una mayor activación de otras proteínas STAT, especialmente Stat5.

Isoformas de Stat1 y de Stat3. Se han identificado dos isoformas de Stat1 y Stat3: α (p91 y p92, respectivamente) y β (p84 y p83, respectivamente) (Schindler *et al.* 1992; Schaefer *et al.*, 1995; Caldenhoven *et al.*, 1996; Chakraborty *et al.* 1996) - que surgen debido al empalme de ARNm alternativo (FIG. 13). A diferencia de Stat1 β (712 aa), en el que la transactivación C-terminal simplemente se elimina, los 55 restos de aminoácidos de Stat3 α se reemplazan en Stat3 β por 7 restos de aminoácidos exclusivos en su extremo C. A diferencia de Stat1 β , Stat3 β no es simplemente un negativo dominante de Stat3 α (Maritano *et al.* 2004) y regula las dianas génicas de una manera distinta de Stat3 β (Maritano *et al.* 2004; Yoo *et al.*, 2002). Se ha demostrado que Stat3 α contribuye a la transformación en modelos celulares y a muchos cánceres humanos, incluido el cáncer de mama. Se demostró que Stat3 α se activa constitutivamente en fibroblastos transformados por oncoproteínas tales como v-Src (Yu *et al.* 1995; García y Jove, 1998) y es esencial para la transformación mediada por v-Src (Turkson *et al.* 1998; Costa-Pereira *et al.*, 2002). A diferencia de Stat3 α , Stat3 β antagonizó la transformación de v-Src mediada por Stat3 α (Turkson *et al.* 1998). La sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de Stat3 α en fibroblastos de rata o ratón inmortalizados indujo su transformación y confirmó la capacidad de formar tumores en ratones atímicos (Bromberg *et al.* 1999). Se ha demostrado que Stat3 se activa constitutivamente en una variedad de tumores hematológicos y sólidos, incluido el cáncer de mama (Dong *et al.* 2003; Redell y Tweardy, 2003) como resultado de la producción del factor de crecimiento autocrino o la desregulación de las proteínas tirosina cinasas. En prácticamente todos los casos, la isoforma que demuestra una mayor actividad es Stat3 α .

Direccionamiento a Stat3 α mientras se evita Stat1. Dados sus múltiples papeles contribuyentes a la oncogénesis, Stat3 ha llamado recientemente la atención como una diana potencial para la terapia contra el cáncer (Bromberg, 2002; Turkson, 2004). Si bien se han empleado con éxito varios métodos de inhibición de Stat3 y se ha establecido una prueba de principio de que el direccionamiento a Stat3 es potencialmente beneficioso en una variedad de sistemas tumorales, incluido el cáncer de mama en el que Stat3 se activa constitutivamente (Epling-Burnette *et al.*, 2001; Yoshikawa *et al.*, 2001; Li y Shaw, 2002; Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Mora *et al.*, 2002; Grandis *et al.*, 2000; Leong *et al.*, 2003; Jing *et al.*, 2003; Jing *et al.*, 2004; Turkson *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2003; Turkson *et al.*, 2004; Uddin *et al.*, 2005); todos tienen posibles limitaciones para la traducción al uso clínico de la terapia contra el cáncer relacionada con problemas relacionados con el suministro, especificidad o toxicidad.

Varios grupos han seguido estrategias específicas que se dirigen a Stat3 mediante la identificación de inhibidores del reclutamiento y/o dimerización de Stat3 (Turkson *et al.* 2001; Ren *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2003; Uddin *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Schust *et al.*, 2006). Como se describe a continuación, esta estrategia tiene el potencial de lograr especificidad basada en la observación de que el motivo peptídico con pY preferido de cada proteína STAT es distinto. Cuando se combina con un enfoque de molécula pequeña, esta estrategia tiene el potencial de superar los problemas de suministro y toxicidad.

Direccionamiento a Stat3 α mientras se evita Stat3 β . Algunas de las características bioquímicas distintas de Stat3 β frente a Stat3 α , especialmente la activación constitutiva y un aumento de 10 a 20 veces en la afinidad de unión al ADN, se han atribuido a la ausencia del dominio de transactivación C-terminal (TAD, por sus siglas en inglés) que da como resultado una mayor estabilidad del dímero Stat3 β (Park *et al.* 1996; Park *et al.*, 2000). El aumento de la estabilidad del dímero probablemente sea el resultado de una mayor afinidad de unión del dominio SH2 a los motivos peptídicos con pY cuando se encuentra en el contexto de Stat3 β en comparación con Stat3 α debido a un impedimento estérico reducido conferido por la eliminación del TAD. Estas características bioquímicas diferenciales entre Stat3 α y Stat3 β se explotan para desarrollar un compuesto químico que se dirige selectivamente a Stat3 α , en algunas realizaciones. Esta selectividad potencia el efecto antitumoral de tales compuestos, en determinados casos, porque evitarían Stat3 β , que funciona para antagonizar las funciones oncogénicas de Stat3 α .

En determinadas realizaciones de la invención, las terapias específicas dirigidas a la señalización Stat3 son útiles para el tratamiento de la anafilaxia.

VI. Terapia de combinación

Es un aspecto de esta invención que una composición como se divulga en el presente documento se usa en combinación con otro agente o método de terapia, tal como el tratamiento de reacción alérgica. La composición o las composiciones (que puede o no ser un inhibidor de Stat3) puede preceder o seguir el tratamiento con otro agente en intervalos que varían de minutos a semanas, por ejemplo. En realizaciones en las que el otro agente y la composición de la invención se aplican por separado a un individuo con anafilaxia, tal como en el momento del suministro a un individuo sospechoso de tener anafilaxia, se sabe que tiene anafilaxia, o está en riesgo de tener anafilaxia, habría que asegurarse, en general, de que no pasara un período de tiempo significativo entre el momento de cada suministro, de manera que el agente y la composición todavía fueran capaces de ejercer un efecto combinado ventajoso en el individuo.

Por ejemplo, en tales casos, se contempla que se pueda poner en contacto al individuo con una, dos, tres, cuatro o más modalidades sustancialmente de forma simultánea (*es decir*, en menos de aproximadamente un minuto) con la composición de la invención. En otros aspectos, uno o más agentes pueden administrarse en aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, hasta aproximadamente 48 horas o más antes y/o después de administrar la composición de la invención. En otras realizaciones determinadas, un agente puede administrarse dentro de aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20, a aproximadamente 21 días antes y/o después de administrar la composición de la invención, por ejemplo. En algunas situaciones, puede ser conveniente prolongar el período de tiempo para el tratamiento de manera significativa, tal como donde transcurren varias semanas (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, o aproximadamente 8 semanas o más) entre las correspondientes administraciones. En algunas situaciones, puede ser conveniente prolongar el período de tiempo para el tratamiento de manera significativa, tal como donde transcurren varios meses (por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, o aproximadamente 8 semanas o más) entre las correspondientes administraciones.

Se pueden emplear distintas combinaciones, la composición de la invención es "A" y el agente secundario, que puede ser cualquier otro agente terapéutico contra el cáncer, es B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de las composiciones terapéuticas de la presente invención a un paciente seguirá generalmente protocolos generales para administración de fármacos, teniendo en cuenta la toxicidad. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario.

Terapias combinadas ejemplares incluyen antihistamínicos, esteroides, epinefrina y así sucesivamente.

VII. Composiciones Farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una composición como se divulga en el presente documento disuelta o dispersada en un transportador farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o cualquier otra perjudicial cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, a un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que en algunos casos contiene al menos un inhibidor de Stat3 de la invención y en algunos casos un principio activo adicional, serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990. Por otra parte, para la administración a animales (p.

ej., seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con la esterilidad, pirogenicidad, estándares generales de seguridad y pureza según las exigencias de los estándares de la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

5 Como se usa en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retardo de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sabría
10 un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Excepto en la medida en donde un transportador convencional cualquiera sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

15 La composición o las composiciones pueden comprender diferentes tipos de transportadores dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o de aerosol y si tienen que ser estériles para dichas vías de administración tal como inyección. La presente invención puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, inyección, infusión, infusión
20 continua, perfusión localizada que riega células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en composiciones lipídicas (p. ej., liposomas), como un aerosol o por otro método o cualquier combinación de los anteriores, como sabría un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990).

25 La cantidad de dosis real de una composición de la presente invención administrada a un individuo puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad a tratar, intervenciones terapéuticas previas o simultáneas y la vía de administración. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración de principio activo (o principios activos) en una
30 composición y la dosis o las dosis adecuadas para el sujeto individual.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1 % de una composición. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 60 %, por ejemplo y cualquier intervalo derivado de los mismos. En otros ejemplos no limitantes,
35 una dosis también puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal, 0,5 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 750 mg/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo que pueda derivarse a partir de los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, etc., basándose en los números descritos
40 anteriormente. En determinadas realizaciones de la invención, se contemplan diversos mecanismos de dosificación. Por ejemplo, la composición se puede administrar una o más veces al día, una o más veces a la semana, o una o más veces al mes y así sucesivamente.

45 En cualquier caso, la composición puede comprender varios antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante conservantes tal como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero sin limitación, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

50 La composición puede formularse en una base libre, neutra o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales formadas con los grupos carboxilo libres derivados de bases inorgánicas tal como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, hidróxidos de calcio o férricos; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

60 En realizaciones donde la composición está en forma líquida, un transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero sin limitación, agua, etanol, poliol (p.ej., glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (p. ej., triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido por dispersión en transportadores tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos;
65 mediante el uso de tensioactivos tal como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos tales métodos. En muchos casos, se preferirá incluir agentes isotónicos, tal como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio

o combinaciones de los mismos.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando la presente invención en la cantidad necesaria del disolvente apropiado con otros ingredientes diferentes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o criodesecación que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido previamente esterilizado por filtración del mismo. El medio líquido debe estar tamponado de manera adecuada en caso necesario y el diluyente líquido se hará isotónico primero, antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los principios activos en un área pequeña.

La composición ha de ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse al mínimo dentro de un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, puede lograrse la absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, tal como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

VIII. Kits

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit y están alojadas en un recipiente adecuado. Los kits comprenderán así, en un recipiente adecuado, una o más composiciones y, en algunos casos, un agente adicional de la presente invención. En algunos casos, existe uno o más agentes distintos a los de la composición de la divulgación que se incluyen en el kit, tal como uno o más agentes para el tratamiento de la anafilaxia. En realizaciones particulares, existe un aparato o cualquier tipo de medio para el diagnóstico de anafilaxia.

Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada. El recipiente de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro recipiente, en el que se puede colocar un componente y preferentemente, distribuir en alícuotas adecuadamente. Cuando existe más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que los componentes adicionales se pueden colocar por separado. Sin embargo, en un vial pueden estar comprendidas diferentes combinaciones de componentes. Los kits de la presente invención también incluirán generalmente un medio para contener la composición, agente adicional y cualquier otro recipiente de reactivos en confinamiento cerrado para su venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico inyectados o moldeados por soplado en los que se conserven los viales deseados.

Las composiciones también pueden formularse en una composición inyectable. En cuyo caso, el recipiente puede ser una jeringa en sí mismo, una pipeta y/u otro aparato similar, a partir del cual la formulación puede aplicarse a un área infectada del cuerpo, inyectarse en un animal y/o incluso aplicarse y/o mezclarse con los otros componentes del kit. Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo/s seco/s. Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también se pueda proporcionar en otro recipiente.

50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los presentes inventores para que funcionen bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Los ejemplos 1-11 son ejemplos de referencia.

Ejemplo 1

MATERIALES Y MÉTODOS EJEMPLARES

Exploración virtual de ligandos. Los inventores aislaron la estructura tridimensional del dominio SH2 de Stat3 de la estructura del fragmento central de los homodímeros de Stat3 fosforilados unidos al ADN (Becker *et al.* 1998) depositado en el banco de datos RCSB Protein Data Bank (PDB) (código PDB 1BG1) y convertido en un sistema compatible con Mecánica de Coordinación Interna (ICM, por sus siglas en inglés) mediante la adición de átomos de hidrógeno, modificando aminoácidos inusuales, haciendo ajustes de carga y realizando etapas de limpieza adicionales. Además, los inventores recuperaron las coordenadas del dominio SH2 de Stat1 del banco de datos PDB (código PDB

1BF5) para su uso en el análisis de selectividad por ordenador (Chen *et al.* 1998). Las bases de datos de sustancias químicas comerciales (Chembridge, Asinex, ChemDiv, Enamine, Keyorganics y Life Chemicals) se eligieron como fuentes de compuestos para la exploración *in silico*. La selección fue el hidrógeno de la amida de E638 dentro del sitio que se une al resto +3 (Q, C o T) dentro del ligando peptídico con pY (Shao *et al.* 2006) como punto central del compartimento de unión, que consistía en un cubo con dimensiones 16,0 x 16,9 x 13,7 angstrom. Además del sitio de unión +3, este cubo contenía el sitio de unión al resto pY que consistía principalmente en R609 y K591 (Shao *et al.* 2006) y un sitio de unión hidrófoba que consiste en Bucle β C- β D y Bucle α B- α C. La alineación de secuencia y la superposición de las estructuras de Stat3 y Stat1 revelaron diferencias sustanciales en la secuencia de estos bucles; la falta de su superposición indicó que esta región podría servir como filtro de selectividad (Cohen *et al.* 2005). Se realizó un cálculo de acoplamiento flexible (Totrov y Abagyan 1997) para determinar la puntuación de energía mínima global y, por lo tanto, predecir la conformación óptima del compuesto dentro del compartimento. Se seleccionó un compuesto para adquisición y pruebas bioquímicas basándose en el cumplimiento de los criterios de análisis de interacción (CIA): 1) puntuación de energía mínima global ≤ -30 , 2) formación de un puente de sal y/o red de enlaces de H dentro del sitio de unión al resto pY y 3) formación de un enlace de H con o bloqueando el acceso al hidrógeno de la amida de E638. La mayor parte, pero no todos, los compuestos interactuaron también con el sitio de unión hidrófoba.

Ensayo de unión de SH2 de Stat3/péptido con pY. Los ensayos de unión de Stat3 se realizaron a 25 °C con un biosensor BIAcore 3000 usando tampón Tris 20 mM pH 8 que contenía mercaptoetanol 2 mM y DMSO al 5 % como tampón en ejecución (Kim *et al.* 2005). Los dodecapéptidos derivados de EGFR biotinilados fosforilados y no fosforilados basados en la secuencia que rodea a Y1068 (Shao *et al.* 2004) se inmovilizaron en un chip sensor recubierto con estreptavidina (BIAcore inc., Picatway NJ). La unión de Stat3 se realizó en tampón Tris 20 mM pH 8 que contenía β -mercaptoetanol 2 mM a un caudal de 10 μ l/min durante 1-2 minutos. Se mezclaron previamente partes alícuotas de Stat3 a 500 nM con compuesto para lograr una concentración final de 1-1.000 μ M y se incubaron a 4 °C antes de inyectarlas en el chip sensor. El chip se regeneró inyectando 10 μ l de glicina 100 mM a pH 1,5 después de cada inyección de muestra. Se ejecutó un control (Stat3 con DMSO, pero sin compuesto) al principio y al final de cada ciclo (40 inyecciones de muestra) para garantizar que la integridad del chip sensor se mantuviera durante todo el ciclo. El promedio de los dos controles se normalizó al 100 % y se usó para evaluar el efecto de cada compuesto sobre la unión de Stat3. Las respuestas se normalizaron dividiendo el valor a los 2 minutos por la respuesta obtenida en ausencia de compuestos a los 2 minutos y multiplicando por 100. Los valores de CI_{50} se determinaron representando gráficamente el % de respuesta máxima en función del logaritmo de la concentración del compuesto y ajustando los puntos experimentales a un modelo de unión competitiva utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros: $R = R_{high} - (R_{high} - R_{low}) / (1 + conc/A1)^{A2}$, donde R = porcentaje de respuesta a la concentración de inhibidor, R_{high} = porcentaje de respuesta sin compuesto, R_{low} = porcentaje de respuesta a la concentración de compuesto más alta, A2 = parámetro de ajuste (pendiente) y A1 = CI_{50} (programa informático BIAevaluation versión 4.1).

Ensayo de Inmunotransferencia. La línea celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) se cultivó en placas de 6 pocillos en condiciones normales. Las células se trataron previamente con compuestos (0, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 μ M) durante 1 hora y después se estimularon en condiciones óptimas con interferón gamma (IFN- γ ; 30 ng/ml durante 30 min) para activar Stat1 o interleucina-6 (IL-6; 30 ng/ml durante 30 min) para activar Stat3 (30-31). Después se cosecharon los cultivos y se extrajeron las proteínas usando tampón con alto contenido de sal, como se describe en (Shao *et al.* 2006). En resumen, los extractos se mezclaron con 2X de tampón de muestra de dodecil sulfato de sodio (SDS) (125 mmol/l de Tris-HCL pH 6,8; SDS al 4 %; glicerol al 20 %; 2-mercaptoetanol al 10 %) en una relación 1:1 y se calentaron durante 5 minutos a 100 °C. Las proteínas (20 μ g) se separaron por SDS-PAGE al 7,5 % y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) (Millipore, Waltham, MA) e se inmunotransfirieron. Se incluyeron en cada gel marcadores de peso molecular teñidos previamente (Biorad, Hercules, CA). Las membranas se probaron en serie con anticuerpos contra pY⁷⁰¹ de Stat1 o pY⁷⁰⁵ de Stat3 seguido de anticuerpos contra Stat1 o Stat3 (Transduction labs, Lexington, KY) y después anticuerpos contra β -actina (Abcam, Cambridge, MA). Las membranas se separaron entre la prueba de anticuerpos usando Tampón de Separación de Transferencia Western Restore™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) según las instrucciones del fabricante. Se usó anti-IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo secundario (Invitrogen Carlsbad, CA) y las membranas se desarrollaron con un sistema de detección de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham Life Sciences Inc.; Arlington Heights, IL.).

Explorar la similitud. Tres compuestos identificados en la exploración de ligando virtual inicial (VLS) -Cpd3, Cpd30 y Cpd188 inhibieron la unión del SH2 de Stat3/péptido con pY y la fosforilación de Stat3 mediada por IL-6 y se eligieron como moléculas de referencia para la exploración de la similitud. Se envió una consulta de similitud de huella para cada compuesto de referencia a Molcart/ICM (Distancia máxima, 0,4). Se calculó la similitud entre cada molécula de referencia y cada molécula de base de datos y los resultados de similitud se clasificaron en orden decreciente de puntuación de similitud de ICM (Eckert y Bajorath 2007). Las bases de datos buscadas incluyeron ChemBridge, LifeChemicals, Enamine, ChemDiv, Asinex, AcbBlocks, KeyOrganics y PubChem para un total de 2,47 millones de compuestos. Todos los compuestos identificados se acoplaron al compartimento de unión del dominio SH2 de Stat3 *in silico*. Los compuestos que cumplían los criterios CIA se adquirieron y probaron como se describe para los compuestos identificados en la exploración primaria.

Ensayo de Cambios de Movilidad Electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés): EMSA se realizó utilizando el

oligonucleótido de doble hélice radiomarcado hSIE como sonda como se describe en (Tweardy *et al.* 1995). En resumen, se prepararon extractos con alto contenido de sal a partir de células HepG2 incubadas sin o con IL-6 (30 ng/ml) durante 30 minutos. La concentración de proteína se determinó mediante el Ensayo Bradford y se incubaron 20 µg de extracto con compuesto (300 µM) durante 60 minutos a 37 °C. La sonda hSIE unida y no unida se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (4,5 %). Los geles se secaron y autorradiografiaron.

Modelado molecular. Todas las configuraciones 3-D del dominio SH2 de Stat3 complejadas con compuestos se determinaron mediante optimización energética global que implica múltiples etapas: 1) la localización de las moléculas orgánicas se ajustó como un todo en una amplitud de 2 Å mediante translaciones aleatorias pseudobrownianas y rotaciones alrededor del centro de gravedad molecular, 2) las variables internas de las moléculas orgánicas se cambiaron al azar. 3) los grupos acoplados dentro de los ángulos de torsión de la cadena lateral del dominio SH2 de Stat3 se muestrearon con sacudidas de probabilidad sesgadas mientras se fijaban las variables restantes de la proteína, 4) las minimizaciones de energía local se realizaron utilizando el Programa de Energía de Conformación Empírica para Péptidos tipo 3 (ECEPP3, por sus siglas en inglés) en el vacío (Nemethy *et al.* 1992) con constante dieléctrica dependiente de la distancia $\epsilon = 4r$, se añadieron la energía del disolvente basada en la superficie y las contribuciones entrópicas de las cadenas laterales proteicas evaluadas y 5) las conformaciones del complejo, que se determinaron por los criterios de Metrópolis, se seleccionaron para el siguiente círculo de exploración de la conformación. La configuración tridimensional inicial del dominio SH2 de Stat1 en un complejo con cada compuesto se predijo y generó mediante superposición, dentro del modelo informático, de las características tridimensionales del SH2 de Stat1 en la configuración tridimensional del dominio SH2 de Stat3 en un complejo con cada compuesto. El modelo informático final de SH2 de Stat1 en un complejo con cada compuesto se determinó por minimización local utilizando mecánica molecular basada en el Campo de Fuerzas de Coordenadas Internas (ICFF, por sus siglas en inglés) (Totrov y Abagyan 1997). Los inventores calcularon la energía de van der Waals del complejo de Stat1 o 3-SH2 unido a cada compuesto utilizando el potencial de Lennard-Jones con el campo de fuerza ECEPP/3 (Nemethy *et al.* 1992).

Microscopía de fluorescencia confocal y de alto rendimiento. La microscopía de fluorescencia confocal y de alto rendimiento (HTFM) de las células MEF/GFP-Stat3 α se realizó como se describe en (Huang *et al.* 2007). En resumen, para microscopía de fluorescencia confocal, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos que contenían un cubreobjetos. Para HTFM, se sembraron células en placas CC3 de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células/pocillo utilizando un sistema de siembra en placa automático. Las células se cultivaron en condiciones normales hasta un 85-90 % de confluencia. Las células se trataron previamente con compuesto durante 1 hora a 37 °C y después se estimularon con IL-6 (200 ng/ml) e IL-6sR (250 ng/ml) durante 30 minutos. Las células se fijaron con formaldehído al 4 % en tampón PEM (PIPES de potasio 80 mM, pH 6,8, EGTA 5 mM pH 7,0, MgCl₂ 2 mM) durante 30 minutos a 4 °C, se inactivaron en 1 mg/ml de NaBH₄ (Sigma) en tampón PEM y se contratiñeron durante 1 minuto en 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma; 1 mg/ml) en tampón PEM. Los cubreobjetos se examinaron por microscopía fluorescente confocal. Las placas se analizaron por HTFM automatizada utilizando la plataforma Cell Lab IC Image Cytometer (IC100) y el programa informático de análisis Cytoshop Versión 2.1 (Beckman Coulter). La translocación nuclear se cuantifica utilizando la fracción localizada en la medición del núcleo (FLIN) (Sharp *et al.* 2006).

Ejemplo 2

IDENTIFICACIÓN POR VLS DE COMPUESTOS QUE BLOQUEARON LA UNIÓN DE STAT3 A SU LIGANDO FOSFOPEPTÍDICO E INHIBIERON LA FOSFILACIÓN DE STAT3 MEDIADA POR IL-6

El protocolo VLS se usó para evaluar un total de 920.000 compuestos similares a fármacos. De estos, 142 compuestos cumplieron los criterios CIA. Estos compuestos se adquirieron y probaron para determinar su capacidad para bloquear la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico en un ensayo de unión basado en resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) y para inhibir la fosforilación mediada por IL-6 de Stat3. Los experimentos de competencia por SPR mostraron que, de los 142 compuestos probados, 3 compuestos, Cpd3, Cpd30 y Cpd188, fueron capaces de competir directamente con el péptido con pY para unirse a Stat3 con valores de CI₅₀ de 447, 30 y 20 µM, respectivamente (FIG. 1 y 3; Tabla 4).

Tabla 4. Valores de CI₅₀ (µM) de 6 compuestos activos

Ensayo	Cpd3	Cpd30	Cpd188	Cpd3-2	Cpd3-7	Cpd30-12
SPR	447 ¹	30	20	256	137	114
pStat3	91	18	73	144	63	60
HTM	131	77	39	150	20	>300

¹Los datos presentados son la media o media \pm DE; ND = No determinado.

Además, cada compuesto inhibió la fosforilación mediada por IL-6 de Stat3 con valores de CI₅₀ de 91, 18 y 73 µM, respectivamente (FIG. 2; Tabla 4).

La exploración de similitud con Cpd3, Cpd30 y Cpd188 identificaron 4.302 compuestos adicionales. La exploración

VLS se realizó con cada uno de estos compuestos, que identificó 41 compuestos que cumplían los criterios CIA; estos se adquirieron y probaron. Los experimentos de competencia por SPR mostraron que, de estos 41 compuestos, 3 compuestos, Cpd3-2, Cpd3-7 y Cpd30-12, fueron capaces de competir directamente con el péptido con pY para unirse a Stat3 con valores de CI_{50} de 256, 137 y 114 μ M, respectivamente (FIG. 1 y 3; Tabla 4). Además, cada compuesto inhibió la fosforilación de Stat3 mediada por IL-6 con valores de CI_{50} de 144, 63 y 60 μ M, respectivamente (FIG. 2; Tabla 4).

Ejemplo 3

10 LA INHIBICIÓN MEDIADA POR COMPUESTO DE LA FOSFORACIÓN ESTIMULADA POR LIGANDO DE STAT3 ES ESPECÍFICA PARA STAT3 FRENTE A STAT1

Mientras Stat3 contribuye a la oncogénesis, en parte, a través de la inhibición de la apoptosis, Stat1 es antioncogénico; media los efectos apoptóticos de los interferones y contribuye a la vigilancia del tumor (Kaplan *et al.* 1998; Ramana *et al.*, 2000). En consecuencia, los compuestos que se dirigen a Stat3 mientras evitan Stat1, dejando sus funciones antioncogénicas sin oposición, pueden dar como resultado un efecto antitumoral sinérgico. Para evaluar la selectividad de los compuestos para Stat3 frente a Stat1, las células HepG2 se incubaron con Cpd3, Cpd30, Cpd188, Cpd3-2, Cpd3-7 y Cpd30-12 (300 μ M) durante 1 hora a 37 °C antes de la estimulación con IFN- γ (FIG. 4). Solo el tratamiento con Cpd30-12 bloqueó la fosforilación de Stat1 mientras que cada uno de los otros cinco compuestos, Cpd3, Cpd30, Cpd188, Cpd3-2 y Cpd3-7, no lo hicieron. Por lo tanto, cinco de los seis compuestos identificados fueron selectivos e inhibieron la fosforilación estimulada por ligandos de Stat3, pero no Stat1.

Ejemplo 4

25 ANÁLISIS DE SECUENCIA Y MODELADO MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE CADA COMPUESTO CON EL DOMINIO SH2 DE STAT3 FRENTE A STAT1

Para comprender a nivel molecular la base en la selectividad de Cpd3, Cpd30, Cpd188, Cpd3-2 y Cpd3-7 y la ausencia de selectividad en el caso de Cpd30-12, se compararon las secuencias de aminoácidos y las estructuras disponibles del dominio SH2 de Stat1 y de Stat3 y también se examinó cómo interactuaba cada compuesto con ambos. La alineación de las secuencias reveló identidad en los restos dentro de Stat3 y Stat1 correspondientes al sitio de unión para el resto pY y el resto +3 (FIG. 5A). Además, la superposición de las estructuras de SH2 de Stat3 y de Stat1 reveló que los bucles que contenían estos sitios de unión estaban superpuestos (FIG. 5B). Por el contrario, la alineación de las secuencias reveló diferencias sustanciales en la secuencia de las regiones del dominio SH2 correspondientes a los bucles que forman el sitio de unión hidrófoba (FIG. 5A). Además, la revisión de la superposición de los dominios SH2 de Stat3 y de Stat1 reveló que, a diferencia de la estrecha aposición de los dos bucles de Stat3 que forman el sitio de unión hidrófoba, los dos bucles correspondientes de Stat1 no están estrechamente unidos para formar un compartimento (FIG. 5B).

Revisión de modelos informáticos de Cpd3, Cpd30, Cpd188, Cpd3-2 y Cpd3-7 en un complejo con el dominio SH2 de Stat3 revelaron que cada uno tiene interacciones significativas con el compartimento de unión del dominio SH2 de Stat3 en los tres sitios de unión, el sitio de unión al resto pY, el sitio de unión al resto +3 y el sitio de unión hidrófoba (FIG. 6A, B, C, D y E). Por el contrario, Cpd30-12 interactúa con el sitio de unión al resto pY y bloquea el acceso al sitio de unión al resto +3 pero no interactúa ni bloquea el acceso al sitio de unión hidrófoba (FIG. 6F). Además, las energías de van der Waals de los 5 compuestos selectivos fueron mucho más favorables para su interacción con los bucles de Stat3 que forman el sitio de unión hidrófoba que con los bucles correspondientes de Stat1 (FIG. 5C). Por lo tanto, el modelado por ordenador indicó que la actividad de los compuestos contra Stat3 procede de su capacidad de interactuar con los sitios de unión para los restos pY y +3 dentro del compartimento de unión, mientras que la selectividad para Stat3 frente a Stat1 procede de la capacidad de los compuestos para interactuar con el sitio de unión hidrófoba dentro del compartimento de unión de SH2 de Stat3, que sirvió como filtro de selectividad.

Ejemplo 5

55 INHIBICIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE STAT3 FOSFORILADO POR CPD3, CPD30, CPD188, CPD3-2 Y CPD3-7 EVALUADA POR HTFM

Después de su fosforilación en Y705, Stat3 experimenta un cambio en la conformación desde la dimerización cabeza a cabeza mediada a través de su dominio de oligomerización N-terminal hasta la dimerización cola a cola mediada por interacciones recíprocas de SH2/ligando peptídico con pY705. Este cambio conformacional se sigue por acumulación nuclear. Se esperaría que los compuestos que se dirigen a las interacciones Sh2/ligando peptídico con pY de Stat3 inhibieran la acumulación nuclear de Stat3. Para determinar si este fue el caso con los compuestos en el presente documento, se empleó un ensayo de translocación nuclear (FIG. 7) usando células de fibroblastos embrionarios murinos (MEF, por sus siglas en inglés) que son deficientes en Stat3 endógeno, pero expresan constitutivamente Stat3 α marcado con GFP a niveles endógenos, MEF/GFP-Stat3 α (Huang *et al.* 2007). La incubación previa de células MEF/GFP-Stat3 α con Cpd3, Cpd30, Cpd188, Cpd3-2 y Cpd3-7, pero no con Cpd30-12, bloqueó de la translocación nuclear mediada por ligando de GFP-Stat3 α con valores de CI_{50} de 131, 77, 39, 150 y 20 μ M (FIG. 7 y Tabla 4).

Ejemplo 6**DESTABILIZACIÓN DE COMPLEJOS DE ADN DE STAT3 POR CPD3 Y CPD3-7**

5 Una vez en el núcleo, los dímeros Stat3 se unen a elementos de ADN específicos para activar y, en algunos casos, reprimir la transcripción génica. Los dodecapéptidos con tirosina fosforilada basados en motivos dentro de los receptores que reclutan Stat3 han demostrado previamente que desestabilizan Stat3 (Chakraborty *et al.* 1999; Shao *et al.*, 2003). Se puede esperar que los compuestos que se unen al sitio de unión a fosfopéptidos de Stat3 hagan lo mismo. Para determinar si este era el caso de cualquiera de los compuestos identificados, se incubaron extractos de células HepG2 estimuladas con IL-6 en reacciones de unión que contenían hSIE radiomarcado (FIG. 8) y cada uno de los cinco compuestos selectivos (300 μ M). La incubación con Cpd3 o Cpd3-7 redujo la cantidad de hSIE desplazada a la mitad o más. Los otros compuestos no tuvieron un efecto detectable sobre la intensidad de la banda Stat3:hSIE. Por lo tanto, 2 de los 5 compuestos selectivos desestabilizaron los complejos Stat3:hSIE.

Ejemplo 7**ENFOQUE EJEMPLAR PARA DETERMINAR INHIBIDORES DE STAT3 PARA CÉLULAS MADRE DE CÁNCER**

20 En el campo del desarrollo de la sonda de Stat3, los inventores se han centrado en las sondas de Stat3 de molécula pequeña (Xu et al., 2009) y son útiles varias características del programa de moléculas pequeñas, incluyendo: 1) un modo de acción claramente definido de estas sondas: se dirigen al dominio de homología Src (SH, por sus siglas en inglés) 2 de Stat3 que está implicado en 2 etapas en la vía de activación de Stat3; 2) su especificidad de acción; y 3) el potencial para usar sondas guía identificadas hasta ahora para identificar sondas con una actividad mayor en 2 a 3 unidades en escala logarítmica basándose en análisis SAR recientes y ejemplares y consideraciones de química de la medicina subyacentes a continuación.

30 En realizaciones específicas, la afinidad de los compuestos se mejora al obtener una mayor afinidad a escala logarítmica al pasar de sondas de 1^a generación a 2^a generación utilizando análisis de farmacóforos en 3-D. Además, la selectividad se mejora a través de realizaciones de modelado, en particular a través de la identificación de un dominio de unión hidrófobo distinto en el compartimento de unión a fosfopéptidos de SH2 de Stat3 frente a SH2 de Stat1 (Xu et al., 2009).

35 Identificación de sondas químicas Stat3 de 1^a generación. Para desarrollar sondas químicas que se dirijan selectivamente a Stat3, los inventores exploraron virtualmente 920.000 compuestos pequeños similares a fármacos acoplado cada uno en el compartimento de unión a péptidos del dominio SH2 de Stat3, que consiste en tres sitios: el sitio de unión al resto pY, el sitio de unión al resto +3 y un sitio de unión hidrófoba, que sirvió como filtro de selectividad (Xu et al., 2009). Tres compuestos (Cpd3, Cpd30 y Cpd188) cumplieron los criterios de análisis de interacción, inhibieron competitivamente la unión de Stat3 recombinante a su ligando peptídico con pY inmovilizado y/o inhibieron la fosforilación de tirosina mediada por IL-6 de Stat3. Estos compuestos se usaron en una exploración de similitud de 2,47 millones de compuestos, que identificó 3 compuestos más (Cpd3-2, Cpd3-7 y Cpd30-12) con actividades similares. Los exámenes de los 6 compuestos activos para la capacidad de inhibir la fosforilación de Stat1 mediada por IFN- γ revelaron que todos excepto Cpd30-12 fueron selectivos para Stat3. El modelado molecular de los dominios SH2 de Stat3 y Stat1 unidos al compuesto reveló que la interacción del compuesto con el sitio de unión hidrófoba era la base en la selectividad. Los 5 compuestos selectivos inhibieron la translocación nuclear a citoplasmática de Stat3, mientras que 3 de 5 compuestos (Cpd3, Cpd30 y Cpd188) indujeron apoptosis preferentemente de líneas celulares ejemplares de cáncer de mama con activación constitutiva de Stat3.

50 Identificación de sondas químicas Stat3 de 2^a generación. La exploración de similitud descrita anteriormente no produjo ningún resultado utilizando Cpd188, el más activo de los 3 compuestos de dirección, tal como el compuesto de consulta. En consecuencia, los inventores repitieron la exploración de similitud en 2-D utilizando el armazón de Cpd188 como estructura de consulta y la biblioteca de Life Chemicals, que dio 207 resultados. Se realizó un análisis de farmacóforos en 3-D en estos 207 compuestos usando Ligand Scout y se adquirieron los 39 compuestos de mejor puntuación y se probaron para determinar la inhibición de la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico por SPR. Todos menos seis de estos 39 compuestos tienen CI50 de SPR medibles, teniendo 19 valores de CI50 iguales o menores que el compuesto precursor y teniendo 2 (Cpd188-9 y Cpd188-15) valores de CI50 una unidad en escala logarítmica menor. El examen de estos 19 compuestos ha revelado una correlación estadísticamente significativa entre las puntuaciones de farmacóforos en 3-D y las CI50 de SPR, así como la puntuación de farmacóforos en 3D y las CI50 para la inhibición de la translocación citoplasmática a nuclear mediada por ligando. Además, tanto Cpd188-9 como Cpd188-15 mostraron una actividad mayor a escala logarítmica en la inducción de apoptosis de la línea celular leucémica humana que el Cpd188 precursor (FIG. 15). Además, Cpd188-38 mostró una actividad 2 unidades en escala logarítmica mayor que el Cpd188 precursor en la inhibición de la translocación citoplasmática a nuclear en el ensayo HTFM, mientras que Cpd188-15 mostró una actividad 1 unidad en escala logarítmica mayor que el Cpd188 precursor en la disminución de MSFE (Tabla 5). Asimismo, varios de los compuestos similares a 188 de segunda generación representan una mejora sustancial sobre Cpd188 desde un punto de vista de química médica, metabolismo y biodisponibilidad. En particular, Cpd188-9 carecía de ambos grupos carboxilo, que en casos particulares mejora la

permeabilidad celular y/o el grupo tioéter, que está sujeto a oxidación. R2=0,2 P=0,013 (μM)

Tabla 5: Sumario de Determinados Compuestos similares a 188 de 2ª Generación

Compuesto	CI ₅₀ de SPR, μM *	CI ₅₀ de HTMF, μM *	Mamosfera ~CI ₅₀ , μM ***
188	20**	32 \pm 4	30-100
188-1	6 \pm 2	26 \pm 4	30
188-9	3 \pm 2	47 \pm 21	10
188-10	8 \pm 3	22 \pm 19	30
188-15	2 \pm 1	49	3
188-16	4 \pm 0	9 \pm 5	30
188-17	4 \pm 2	76	30
188-18	4 \pm 1	27 \pm 8	30
188-33	19 \pm 9	0,4 \pm 0,1	10-30
media \pm DE			
** Xu et al PLoS ONE			
*** Células SUM159PT y HS578T en placa (6 pocillos por prueba) sin o con compuesto a 1, 10 o 100 μM , incubadas 3 d; esferas contadas en el día 3.			

- 5 Análisis de la relación estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés) de las sondas de Stat3 de 2ª generación. La totalidad de los 39 compuestos de segunda generación descritos anteriormente, más Cpd188 en sí mismo, son derivados de N-naft-1-ilbencenosulfamida. Tras un cuidadoso análisis de sus relaciones estructura-actividad (SAR), los inventores descubrieron que la mayoría de estos compuestos similares a Cpd188 (38 de 40: los 2 restantes son débiles y se describirán a continuación en EXP ID) se pueden dividir en tres grupos estructurales en una tendencia general de disminución de la actividad, tal como se muestra en la FIG. 16. Cinco compuestos en el Grupo III son en realidad los precursores de los compuestos en los Grupos I y II. La adición de una variedad de grupos (el grupo -R resaltado en rojo en la estructura general del Grupo I en la FIG. 16), tal como un grupo triazol-3-il-mercaptop (188-15) o cloro (188-10), a la posición 3 del anillo de naftilamina condujo a los compuestos del Grupo I, que son las series más potentes de sondas de Stat3. En una realización específica, este es el contribuyente más importante a la actividad inhibidora: se encuentran un total de ocho sustituyentes en 3 en los compuestos del Grupo I, que potencian invariablemente la actividad en varios órdenes de magnitud.

La mayoría de las sondas de Stat3 en el Grupo II contienen un anillo de 5 miembros que combina los grupos 3-R y 4-OR2, tal como un furano (188-11). Sin embargo, los compuestos en este grupo son, en promedio, ~ 5 veces menos activos que los compuestos del Grupo I, lo que indica que, en determinados aspectos, el átomo de H del grupo 4-hidroxi (resaltado en azul en la estructura general del Grupo I en la FIG. 16) es importante, p. ej., implicado en un enlace de H favorable con la proteína. La falta de capacidad para formar el enlace de H se atribuye a las actividades más débiles de las sondas del Grupo II, en casos particulares. Estas consideraciones subyacen a un enfoque de química médica que se describe a continuación.

Ejemplo 8

QUÍMICA MÉDICA PARA SÍNTESIS DE SONDAS DE SULFAMIDA DE STAT3 SIMILARES A 188 DE 3ª GENERACIÓN

La estructura cristalina de Stat3 muestra que el dominio SH2 tiene un área de unión grande, ampliamente dispersa y generalmente poco profunda con varios valles y colinas que reconocen el ligando peptídico con pY (FIG. 18). El modelado molecular basado en estructura (acoplamiento) fue útil para identificar la contribución de la superficie de unión hidrófoba del dominio SH2 de Stat3 como filtro de selectividad (Xu et al., 2009). Sin embargo, diferentes programas de acoplamiento dieron distintas posiciones de unión para la misma sonda sobre la superficie de unión con afinidades de unión pronosticadas similares. Los inventores, por lo tanto, en realizaciones particulares, basándose en los resultados iniciales de SAR descritos anteriormente, utilizan la química médica tradicional para llevar a cabo un estudio ejemplar integral de la relación estructura- actividad, para optimizar la actividad, así como la selectividad de esta nueva clase de sondas de sulfamida de Stat3. El compuesto 188-15 sirve de armazón para preparar los compuestos de nueva generación, como se muestra esquemáticamente (FIG. 16).

Además, la química para preparar estos compuestos es sencilla con un buen rendimiento, que implica la reacción de un cloruro de sulfonilo con una anilina/amina, que puede obtenerse comercialmente o sintetizarse fácilmente.

- 45 Para las modificaciones propuestas que se describen a continuación, se puede consultar la FIG. 17). EXP IA. Modificación 1. Ya que casi todas las sondas de 2ª generación contienen un grupo fenilsulfonilo, la primera etapa hacia la optimización de la actividad se centra en sintetizar una serie de compuestos que tienen un grupo más grande (p.

ej., bicíclico o tricíclico) o un grupo alquilsulfonilo. La vía de síntesis general se muestra a continuación:

Existen alrededor de 4.300 cloruros de sulfonilo disponibles comercialmente, entre los cuales 25, tal como los que se muestran anteriormente, se seleccionan para preparar sondas. La anilina 2, que es el componente de amina del compuesto 188-10 (FIG. 16), una de las sondas más activas, se prepara fácilmente en una reacción simple de dos etapas a partir del compuesto nitro 1. Primero se pueden preparar 25 compuestos (por ejemplo) y probar sus actividades en unos ensayos de SPR *in vitro* de rendimiento rápido e *in vivo* de HTFM. Basándose en los resultados del estudio de la relación estructura-actividad, se pueden diseñar, sintetizar y probar más compuestos de forma iterativa hasta la optimización de esta modificación.

EXP IB. Modificación 2. A continuación, se puede modificar el sustituyente 3 del anillo de naftilamina, basado en la estructura del compuesto 188-15, por ejemplo. Estudios previos de SAR demostraron que este sustituyente es útil para la actividad de esta clase de sondas, en determinadas realizaciones. Sin embargo, un total de 8 grupos en esta posición con una gran diferencia de tamaño, de un solo átomo Cl a un gran grupo bicíclico de benzotiazol-2-ilmercapto, mostraron actividades similares. Esta característica indica que, en determinadas realizaciones, las modificaciones en esta posición deberían centrarse más en otras propiedades, tales como interacciones electrostáticas con la proteína, como se ejemplifica a continuación. Además, muchos de estos grupos son tioéteres, que pueden estar sujeto a oxidación/degradación *in vivo* y conducir a un perfil farmacocinético desfavorable, en aspectos particulares. El átomo central -S- se cambia a isómeros metabólicamente más estables, tal como -CH₂-, -NH- y -O-, en determinados casos. En determinados aspectos, se pueden sintetizar los siguientes compuestos para optimizar el sustituyente en 3:

La síntesis también se inicia desde 1, en determinados casos. La halogenación regioselectiva y la formilación en la posición 3 da lugar a dos compuestos, es decir, compuesto 3 con bromo o yodo y 4 con aldehído, que son compuestos de partida versátiles, comunes para introducir una amplia gama de sustituyentes en esta posición (por ejemplo, los enumerados anteriormente).

Por otra parte, la estructura cristalina del dominio SH2 de Stat3 también proporciona una fuerte evidencia de que son útiles más compuestos con diferentes propiedades electrostáticas para la caracterización. La superficie molecular electrostática de la proteína muestra dos características distintas, tal como se muestra en la FIG. 18. La primera es la superficie Glu638 cargada negativamente que se destaca en el centro. A continuación, de particular interés es un área cargada positivamente, compuesto por Arg609 y Lys591 ubicadas en el borde del dominio, que es en realidad el sitio de unión a pY (tirosina fosforilada) del receptor. Los inventores también encontraron que la introducción de un grupo con carga negativa dirigido al sitio de unión a pY conduce a sondas particularmente activas, en determinadas realizaciones. Por ejemplo, el estudio de acoplamiento del compuesto 5 con 3-fosfometil (R = CH₂PO₃²⁻) mostraron que todos los grupos fosfonato de las 20 posiciones de acoplamiento están agrupados y ubicados en el sitio de unión a pY, indicando fuertes interacciones electrostáticas y de enlace de H con los restos Arg609 y Lys591 (FIG. 18).

EXP IC. Modificaciones 3 y 4. Comúnmente, las modificaciones 3 y 4 prueban los efectos de cambiar los sustituyentes en las posiciones 4, 5 y 6. El -OH en la posición 4 puede ser superior a -OR, en determinados aspectos. Se puede probar si el átomo de H en -OH es responsable de una mejor actividad sintetizando los compuestos 6 (5 acilado o alquilado), como se muestra esquemáticamente a continuación. Además, los compuestos 7 deshidroxi también pueden prepararse, a partir de 3-bromonaftil-1-amina.

Con respecto a los métodos sintéticos generales para modificar las posiciones 5 y 6, primero se puede sintetizar alrededor de una docena de estos compuestos en esta categoría y si surgen compuestos muy activos, se pueden hacer más compuestos para optimizar la actividad para estas dos posiciones.

EXP ID. Modificación 5. Aquí se muestran los únicos dos compuestos no incluidos en el análisis SAR (debido a un sustituyente en 4 diferente), así como sus actividades inhibitorias contra Stat3:

A pesar de la débil actividad, es favorable enmascarar el H polar de la sulfamida para el segundo compuesto, en determinados aspectos, que proporciona una ruta fácil para preparar sondas más potentes. Por lo tanto, se puede usar el siguiente método para preparar una serie de N-acil o N-alquil sulfamidas 5:

55 Ejemplo 9

IDENTIFICACIÓN DE SONDAS QUÍMICAS SELECTIVAS DE STAT3 DE COMPUESTOS DE SULFAMIDA SINTETIZADOS EN EL EJEMPLO 11

En cada nuevo compuesto de sulfamida se analiza la capacidad de inhibir la unión de Stat3 a su ligando fosfopeptídico por SPR y la capacidad de bloquear la translocación citoplasmática a nuclear estimulada por IL-6 en el ensayo HTFM. Las sondas con actividad en estos ensayos equivalentes o mayores que los compuestos de 2ª generación más activos se prueban para determinar la inhibición de la fosforilación de Stat3 estimulada por IL-6 y la falta de capacidad para inhibir la fosforilación de Stat1 estimulada por IFN-γ como se describe a continuación.

EXP IIA. Ensayo SPR de inhibición de la unión Stat3/péptido con pY. Los ensayos de unión Stat3 péptido con pY se

realizan a 25 °C usando un biosensor BIAcore 3000 como se describe en (Xu et al., 2009). En resumen, los dodecapéptidos derivados de EGFR biotinilados fosforilados y no fosforilados de control basados en la secuencia que rodea a Y1068 se inmovilizan en un chip sensor recubierto con estreptavidina (BIAcore Inc., Piscataway NJ). La unión de Stat3 se realiza en tampón Tris 20 mM pH 8 que contiene β-mercaptoetanol 2 mM a un caudal de 10 μl/min durante 1-2 minutos. Se mezclan previamente partes alícuotas de Stat3 a 500 nM con compuesto para lograr una concentración final de 1-1.000 uM y se incubaron a 4 °C antes de inyectarlas en el chip sensor. El chip se regenera inyectando 10 μl de glicina 100 mM a pH 1,5 después de cada inyección de muestra. Se ejecuta un control (Stat3 con DMSO, pero sin compuesto) al principio y al final de cada ciclo (40 inyecciones de muestra) para garantizar que la integridad del chip sensor se mantenga durante toda la ejecución del ciclo. El promedio de los dos controles se normaliza al 100 % y se usa para evaluar el efecto de cada compuesto sobre la unión de Stat3. Las respuestas se normalizan dividiendo el valor a los 2 minutos por la respuesta obtenida en ausencia de compuestos a los 2 minutos y multiplicando por 100. Los valores de CI₅₀ se determinan representando gráficamente el % de respuesta máxima como función del logaritmo de la concentración del compuesto y ajustando los puntos experimentales a un modelo de unión competitiva utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros: $R = R_{high} - (R_{high} - R_{low}) / (1 + conc/A1)^{A2}$, donde R = porcentaje de respuesta a la concentración de inhibidor, R_{high} = porcentaje de respuesta sin compuesto, R_{low} = porcentaje de respuesta a la concentración de compuesto más alta, A2 = parámetro de ajuste (pendiente) y A1 = CI₅₀ (programa informático BIAevaluation versión 4.1).

EXP IIB. Microscopía de fluorescencia de alto rendimiento (HTFM), ensayos de inhibición de la translocación de citoplasma a núcleo. La HTFM de las células MEF/GFP-Stat3α se realiza para evaluar la capacidad de las sondas para inhibir la translocación citoplasmática a nuclear de GFP-Stat3, tal como se describe en (Xu et al., 2009), utilizando el sistema robótico disponible como parte del John S. Dunn Gulf Coast Consortium for Chemical Genomics en la Facultad de Medicina de la Universidad de Texas-Houston. En resumen, las células se siembran en placas CC3 de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células/pocillo y se cultivan en condiciones normales hasta un 85-90 % de confluencia. Las células se tratan previamente con compuesto durante 1 hora a 37 °C y después se estimulan con IL-6 (100 ng/ml) e IL-6sR (150 ng/ml) durante 30 minutos. Las células se fijan con formaldehído al 4 % en tampón PEM (PIPES de potasio 80 mM, pH 6,8, EGTA 5 mM pH 7,0, MgCl₂ 2 mM) durante 30 minutos a 4 °C, se inactivan en 1 mg/ml de NaBH₄ (Sigma) en tampón PEM y se contratiñen durante 1 minuto en 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma; 1 mg/ml) en tampón PEM. Las placas se analizan mediante HTFM automatizada utilizando la plataforma Cell Lab IC Image Cytometer (IC100) y el software de análisis Cytoshop Versión 2,1 (Beckman Coulter).

La translocación nuclear se cuantifica utilizando la fracción localizada en la medición del núcleo (FLIN). Los valores de FLIN se normalizan restando el FLIN para las células no estimuladas y dividiendo después esta diferencia por la diferencia máxima (delta, Δ) en FLIN (FLIN en células estimuladas con IL-6/sIL-6R en ausencia de compuesto menos FLIN de células no estimuladas). Esta relación se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de diferencia máxima en FLIN y se representa gráficamente en función del logaritmo de la concentración de compuesto. Se determinan la curva con mejor ajuste y el valor de CI₅₀ utilizando el modelo logístico de 4 parámetros/Dosis Respuesta/XLfit 4.2, programa informático IDBS.

EXP IIC. Ensayos de inhibición de pStat3 y pStat1 mediados por ligando. Las sondas Stat3 recién sintetizadas con actividad equivalente o mayor que la del compuesto precursor 188 en los ensayos de SPR y HTFM se evaluarán para determinar la capacidad de inhibir selectivamente la fosforilación mediada por ligando de Stat3 como se describe en (Xu et al., 2009). En resumen, las células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) se cultivan en placas de 6 pocillos y se tratan previamente con compuestos (0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM) durante 1 hora y después se estimulan en condiciones óptimas con interleucina-6 (IL-6; 30 ng/ml durante 30 min) para activar Stat3 o interferón gamma (IFN-γ; 30 ng/ml durante 30 min) para activar Stat1. Las células se cosechan y las proteínas se extraen usando tampón con alto contenido de sal, mezclado con 2X de tampón de muestra de dodecil sulfato de sodio (SDS) (125 mmol/l Tris-HCL pH 6,8; SDS al 4 %; glicerol al 20 %; 2-mercaptoetanol al 10 %) en una relación 1:1 y se calientan durante 5 minutos a 100 °C. Las proteínas (20 μg) se separan por SDS-PAGE al 7,5 % y se transfieren a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Waltham, MA) e se inmunotransfieren. Las membranas se prueban en serie con anticuerpo contra pY701 de Stat1 o pY705 de Stat3 seguido de anticuerpo contra Stat1 o Stat3 (Transduction labs, Lexington, KY) y después anticuerpos contra β-actina (Abcam, Cambridge, MA). Las membranas se separan entre pruebas de anticuerpos usando Tampón de Separación de Transferencia Western Restore™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) según las instrucciones del fabricante. Se usa anti-IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo secundario (Invitrogen Carlsbad, CA) y las membranas se desarrollan con un sistema de detección de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham Life Sciences Inc.; Arlington Heights, IL.). Las intensidades de banda se cuantifican por densitometría. El valor de cada banda de pStat3 se divide por su intensidad de banda de Stat3 total correspondiente; los resultados se normalizan al valor de control tratado con DMSO. Este valor se representó gráficamente en función del logaritmo de la concentración de compuesto. La curva con mejor ajuste se determina utilizando el Modelo Logístico de 4 Parámetros/Dosis Respuesta/XLfit 4,2, programa informático IDBS y se utilizó para calcular el valor de CI₅₀.

EXP IID. Modelado molecular de las interacciones sonda-Stat3. Los resultados del modelado de la unión de la sonda de primera generación a los dominios SH2 de Stat3 frente a los de Stat1 sugirieron que la base para la selectividad experimental de las sondas para Stat3 frente a Stat1 dependían de la capacidad de las sondas de tener una mayor interacción con el sitio de unión hidrófoba dentro del compartimento de unión al péptido con pY de Stat3 en

comparación con Stat1. Por lo tanto, el sitio de unión hidrófoba sirvió como filtro de selectividad. Para probar si este sigue siendo el caso de las sondas de 3ª generación recién sintetizadas, se pueden usar 2 programas de acoplamiento complementarios GLIDE (Schrodinger) e ICM (MolSoft) para determinar la configuración de acoplamiento de energía más baja de cada sonda dentro del dominio de unión al péptido pY del dominio SH2 de Stat3 y de Stat1. Se pueden

5 revisar los modelos informáticos de cada sonda en un complejo con el dominio SH2 de Stat3 frente al de Stat1 y, en particular, comparar las energías de van der Waals y determine si son equivalentes para su interacción con el dominio SH2 de Stat3 frente al dominio SH2 de Stat1. Fue este cálculo el que determinó la selectividad de las sondas de 1ª

10 generación para Stat3 frente a Stat1. En particular, los cálculos de las energías de van der Waals implicaron restos que forman el sitio de unión hidrófoba (W623, Q635, V637, Y640 e Y657) como críticos para esta selectividad.

Hay identificación de sondas con una actividad de una unidad en escala logarítmica o mayor que las sondas de 2ª generación en ensayos de SPR, HTFM y pStat3. Asimismo, en determinados aspectos, algunas de las sondas de 3ª generación más activas que surgen de este análisis son selectivas para Stat3 frente a Stat1 basándose en su mayor

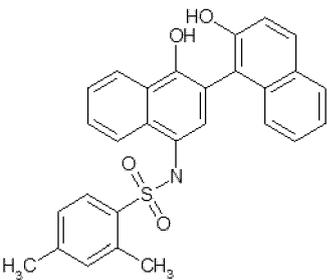
15 interacción con el sitio de unión hidrófoba dentro del compartimento de unión al péptido con pY de SH2 de Stat3 frente al de Stat1.

Ejemplo 10

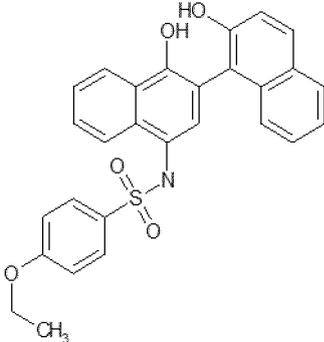
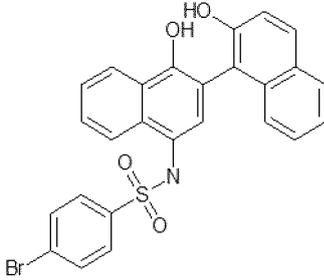
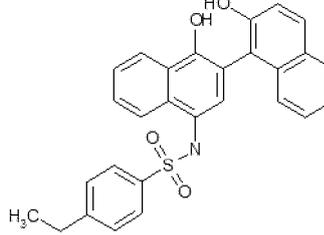
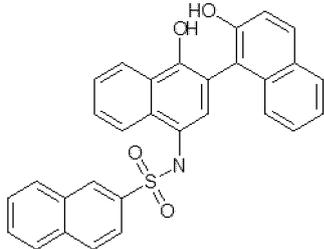
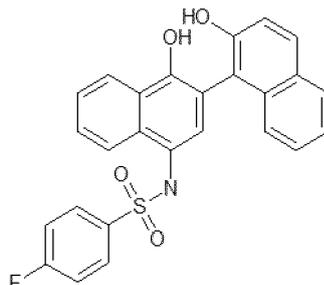
COMPOSICIONES DE REFERENCIA

20 Las composiciones de referencia se proporcionan en la Tabla 7 a continuación.

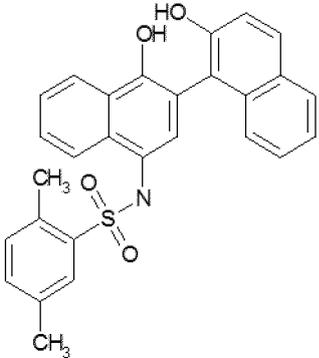
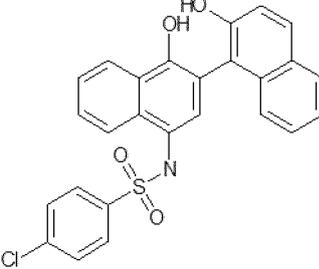
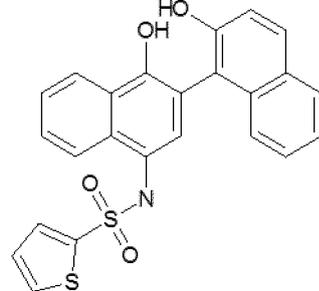
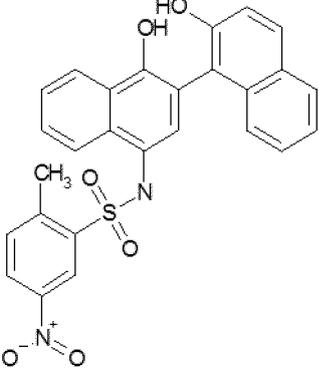
TABLA 7

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F0808-0081		C28H23NO4S	469,5638	7,101

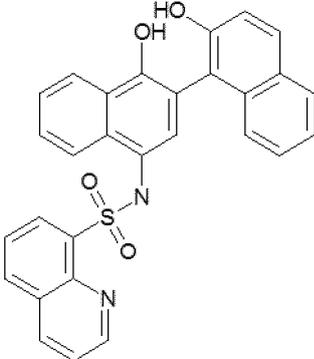
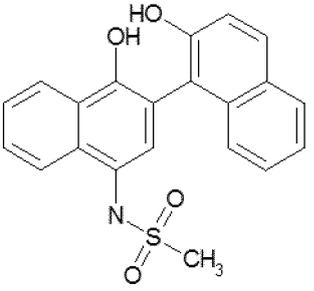
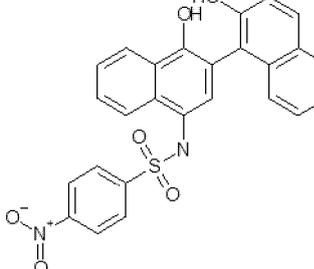
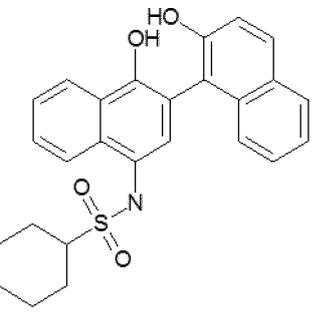
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F0808-0084		C28H23NO5S	485,5632	6,767
F0808-0085		C26H18BrNO4S	520,4057	7,268
F0808-0086		C28H23NO4S	469,5638	7,243
F0808-0089		C30H21NO4S	491,5702	7,729
F0808-0091		C26H18FNO4S	459,5001	6,623

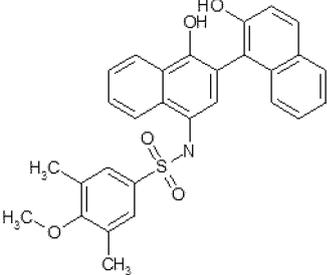
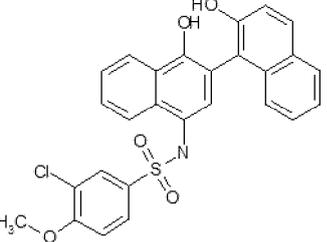
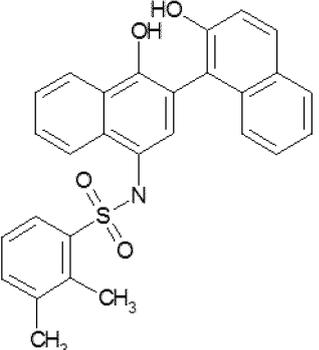
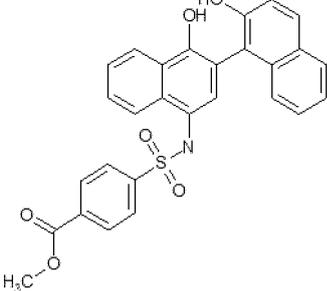
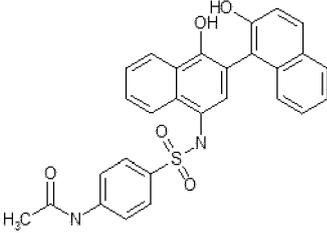
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F0808-0092		C28H23NO4S	469,5638	7,101
F0808-0094		C26H18ClNO4S	475,9547	7,062
F1269-0222		C24H17NO4S2	447,5354	5,983
F1269-2003		C27H20N2O6S	500,5343	6,738

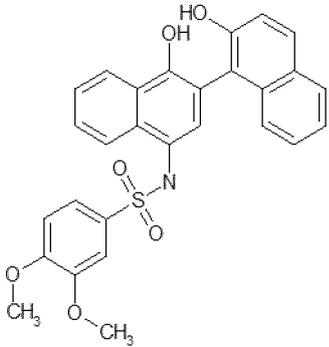
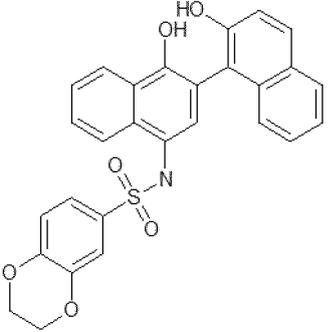
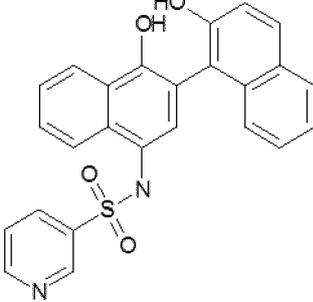
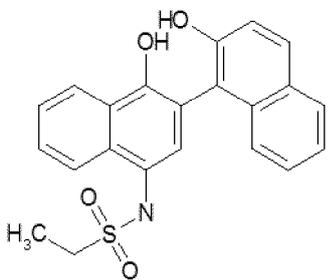
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F1566-1138		C29H20N2O4S	492,5578	6,67
F5749-0001		C21H17NO4S	379,4379	4,816
F5749-0002		C26H18N2O6S	486,5072	6,405
F5749-0003		C26H25NO4S	447,5575	6,795

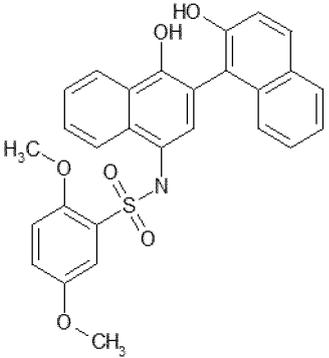
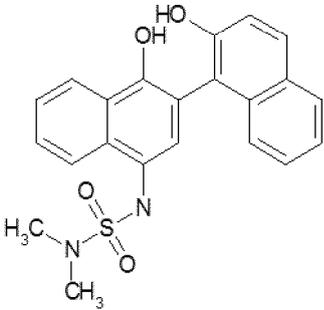
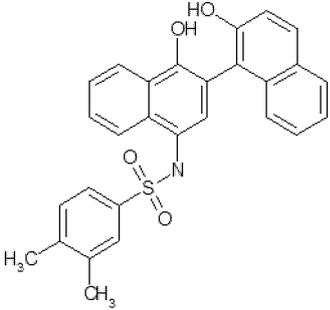
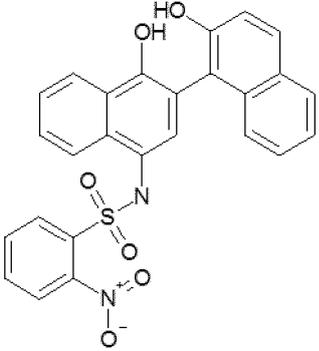
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0004		C29H25NO5S	499,5903	7,092
F5749-0005		C27H20ClNO5S	505,9812	7,053
F5749-0006		C28H23NO4S	469,5638	7,062
F5749-0007		C28H21NO6S	499,5467	6,411
F5749-0008		C28H22N2O5S	498,5619	5,761

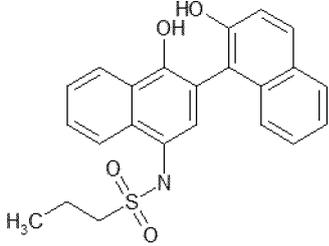
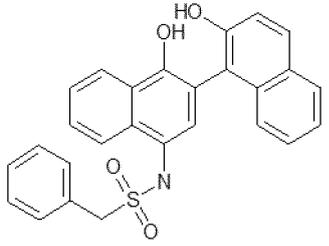
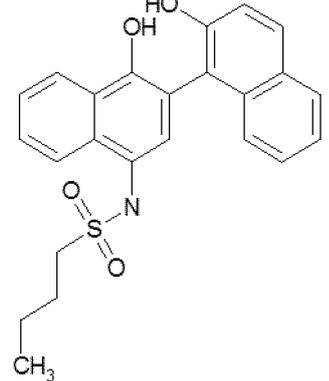
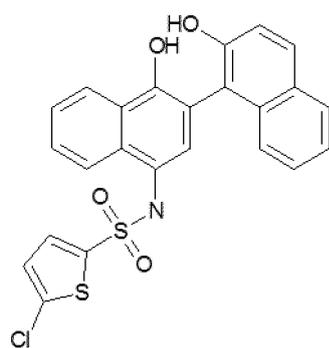
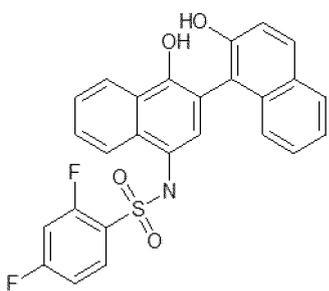
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0009		C28H23NO6S	501,5626	6,16874
F5749-0010		C28H21NO6S	499,5467	6,065
F5749-0011		C25H18N2O4S	442,4972	5,237
F5749-0012		C22H19NO4S	393,465	5,329

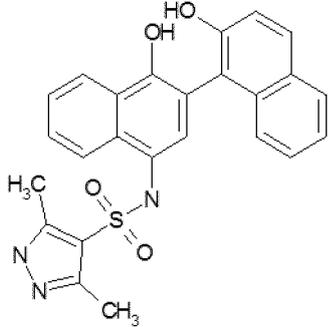
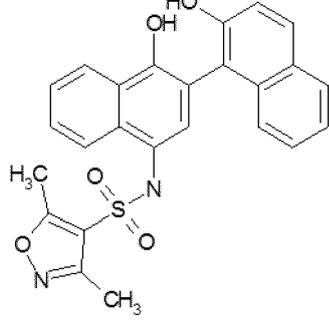
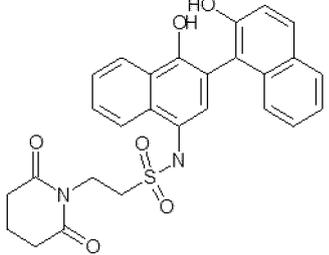
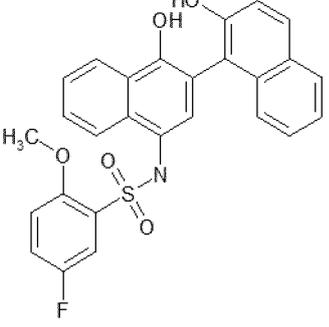
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0013		C28H23NO6S	501,5626	6,417
F5749-0014		C22H20N2O4S	408,4797	4,364
F5749-0015		C28H23NO4S	469,5638	7,101
F5749-0016		C26H18N2O6S	486,5072	6,403

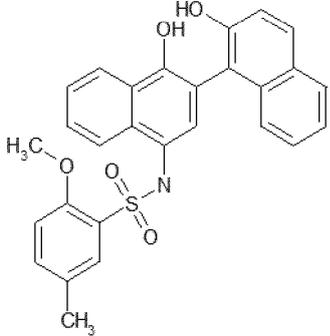
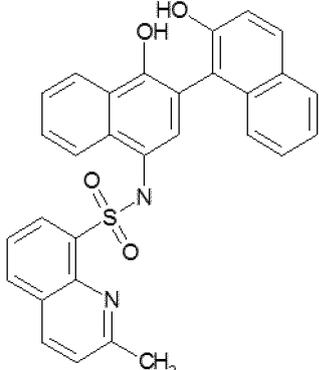
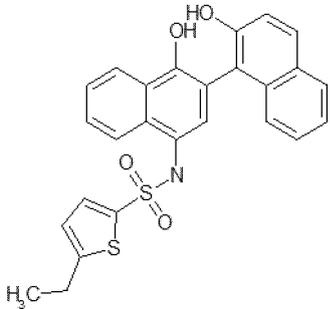
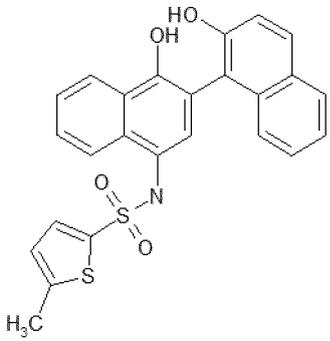
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0017		C23H21NO4S	407,4921	5,771
F5749-0018		C27H21NO4S	455,5367	6,604
F5749-0019		C24H23NO4S	421,5192	6,213
F5749-0020		C24H16ClNO4S2	481,9804	7,273
F5749-0021		C26H17F2NO4S	477,4905	6,811

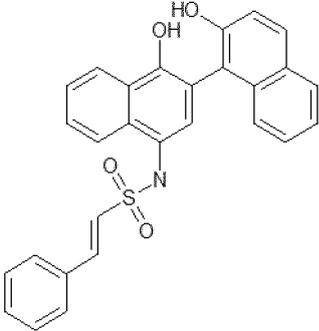
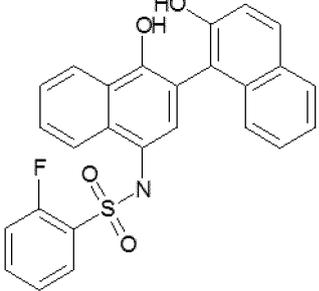
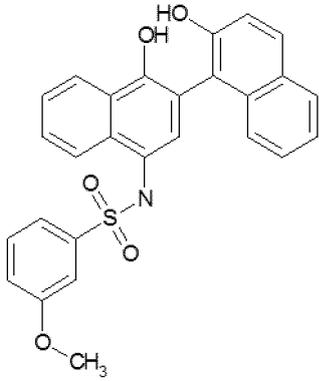
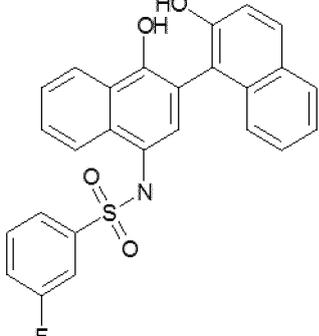
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0022		C25H21N3O4S	459,5278	5,58
F5749-0023		C25H20N2O5S	460,5126	5,614
F5749-0024		C27H24N2O6S	504,5661	4,257
F5749-0025		C27H20FNO5S	489,5266	6,614

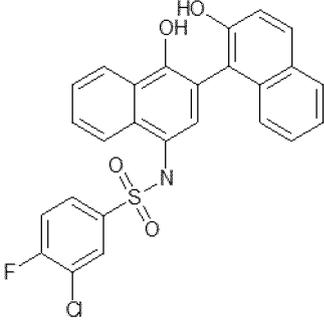
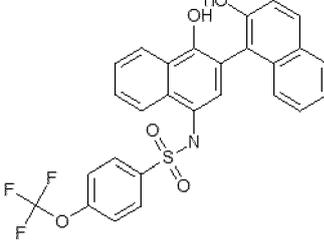
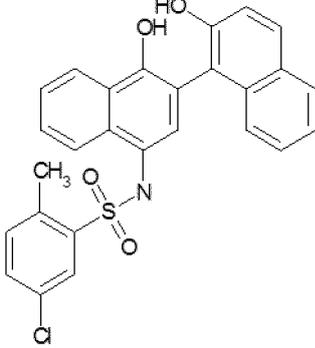
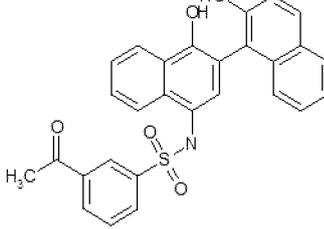
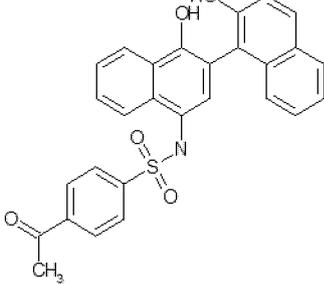
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0026		C28H23NO5S	485,5632	6,759
F5749-0027		C30H22N2O4S	506,5848	6,929
F5749-0028		C26H21NO4S2	475,5896	7,121
F5749-0029		C25H19NO4S2	461,5625	6,646

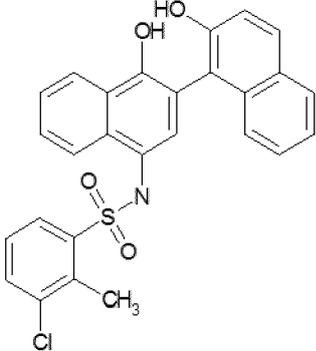
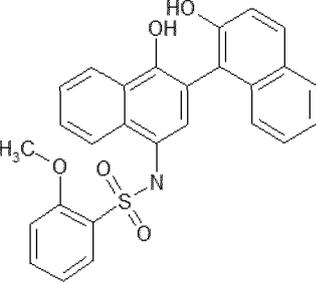
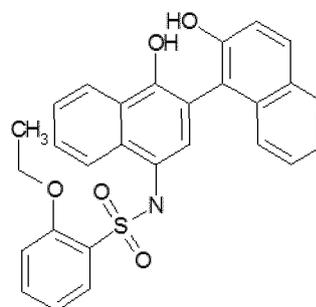
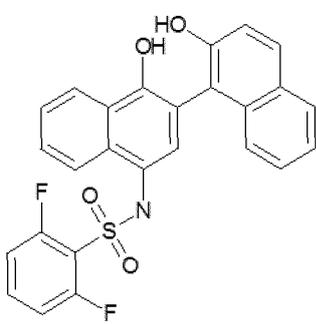
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0030		C28H21 NO4S	467,5479	6,828
F5749-0031		C26H18FNO4S	459,5001	6,621
F5749-0032		C27H21NO5S	471,5361	6,463
F5749-0033		C26H18FNO4S	459,5001	6,66

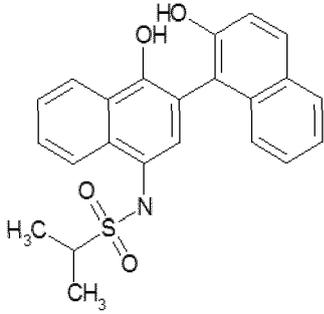
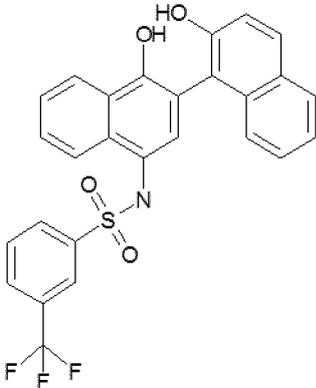
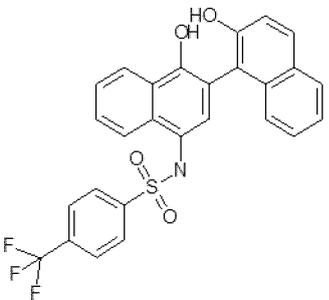
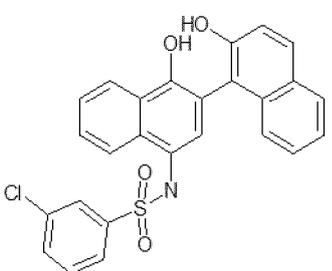
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0034		C26H17ClFNO4S	493,9451	7,25
F5749-0035		C27H18F3NO5S	525,5074	7,86876
F5749-0036		C27H20ClNO4S	489,9818	7,395
F5749-0037		C28H21NO5S	483,5473	6,36
F5749-0038		C28H21NO5S	483,5473	6,323

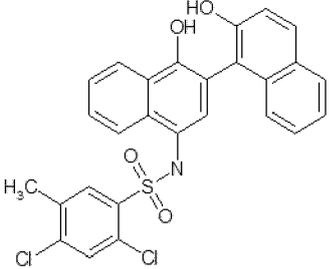
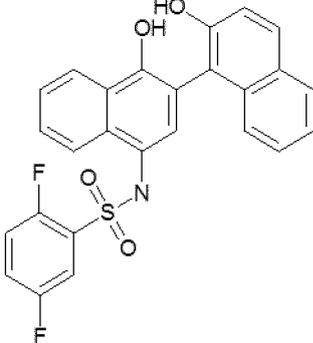
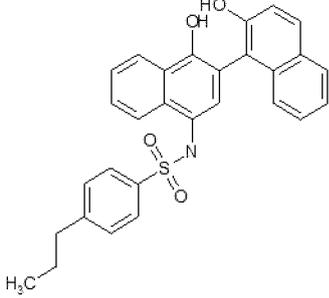
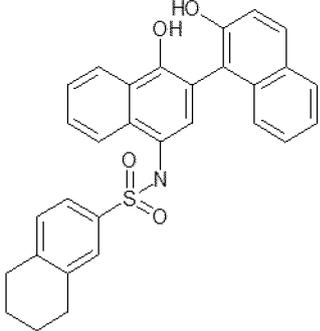
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0039		C27H20ClNO4S	489,9818	7,356
F5749-0040		C27H21NO5S	471,5361	6,424
F5749-0041		C28H23NO5S	485,5632	6,765
F5749-0042		C26H17F2NO4S	477,4905	6,772

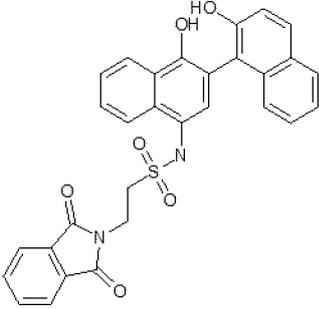
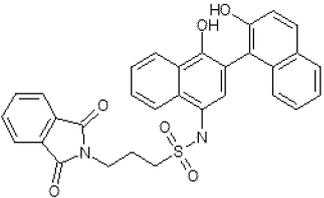
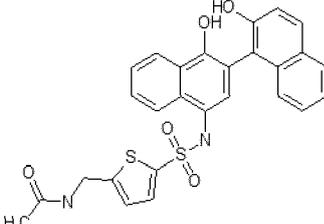
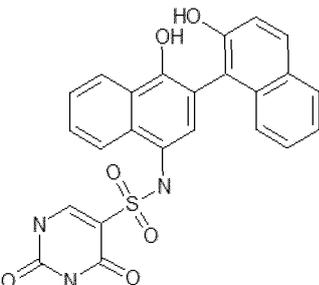
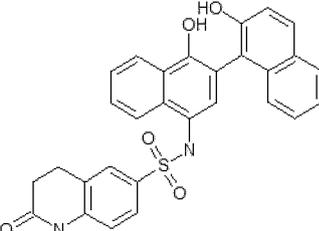
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0043		C23H21 NO4S	407,4921	5,963
F5749-0044		C27H18F3NO4S	509,508	7,44176
F5749-0045		C27H18F3NO4S	509,508	7,40476
F5749-0046		C26H18ClNO4S	475,9547	7,099

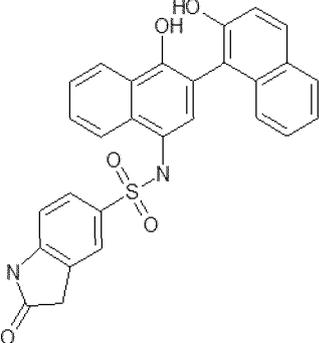
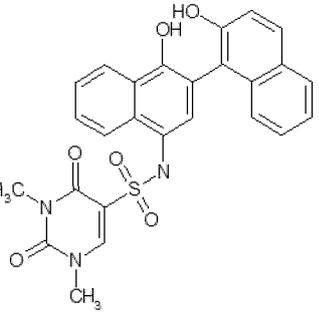
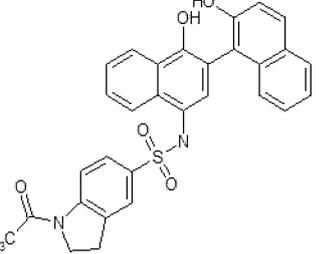
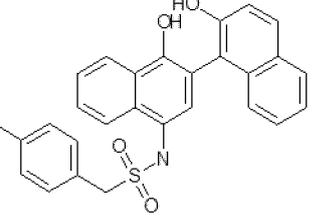
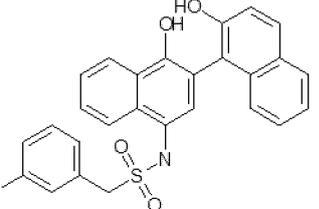
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0047		C27H19Cl2NO4S	524,4268	8,022
F5749-0048		C26H17F2NO4S	477,4905	6,811
F5749-0049		C29H25NO4S	483,5909	7,685
F5749-0050		C30H25NO4S	495,6021	7,557

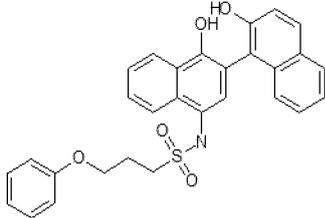
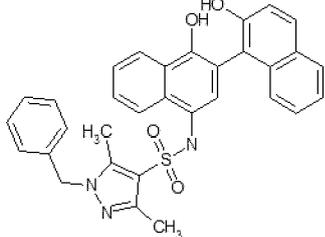
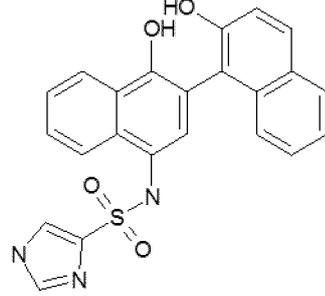
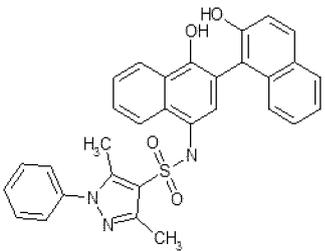
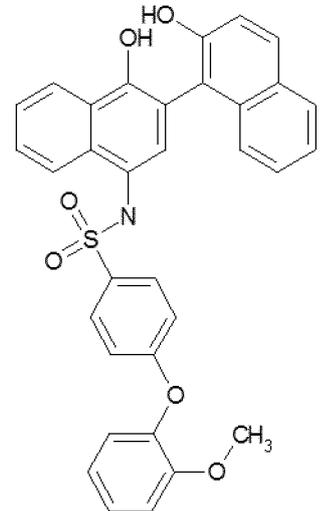
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0051		C30H22N2O6S	538,5836	5,597
F5749-0052		C31H24N2O6S	552,6107	6,039
F5749-0053		C27H22N2O5S2	518,6148	5,773
F5749-0054		C24H17N3O6S	475,4836	3,515
F5749-0055		C29H22N2O5S	510,5731	5,666

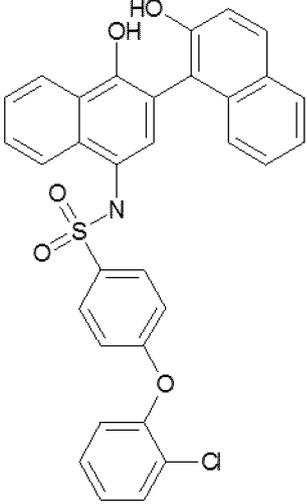
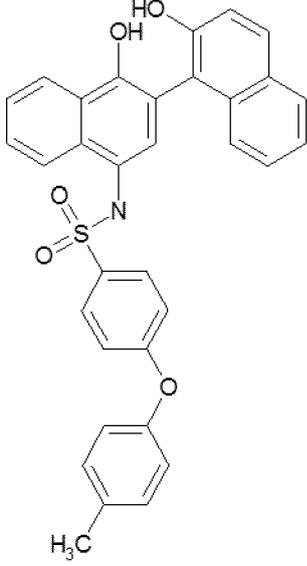
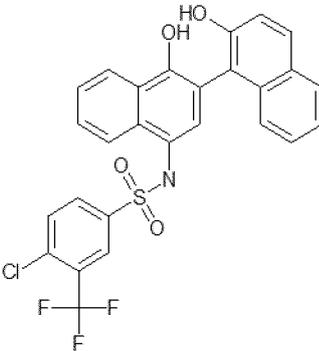
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0056		C28H20N2O5S	496,546	5,578
F5749-0057		C26H21N3O6S	503,5378	3,579
F5749-0058		C30H24N2O5S	524,6002	5,901
F5749-0059		C27H20FNO4S	473,5272	6,757
F5749-0060		C27H20FNO4S	473,5272	6,794

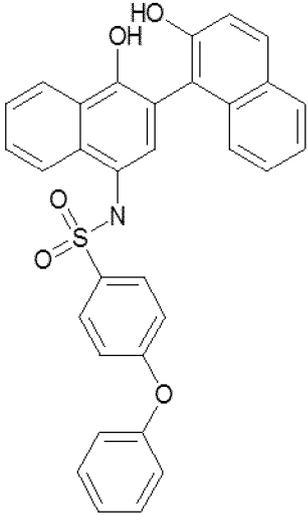
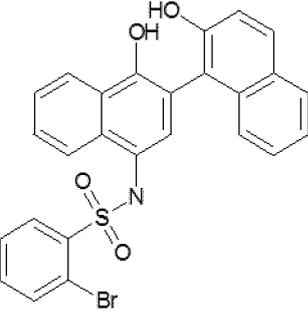
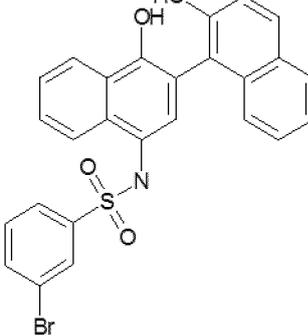
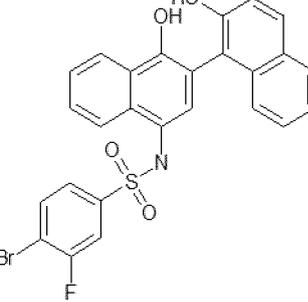
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0061		C29H25NO5S	499,5903	6,83
F5749-0062		C32H27N3O4S	549,6537	6,749
F5749-0063		C23H17N3O4S	431,4736	4,61
F5749-0064		C31H25N3O4S	535,6266	6,615
F5749-0065		C33H25NO6S	563,6343	7,78574

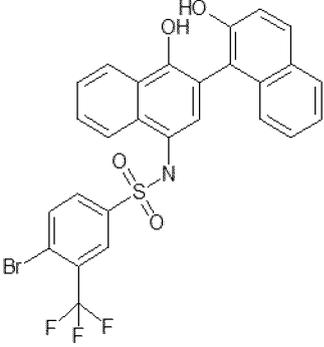
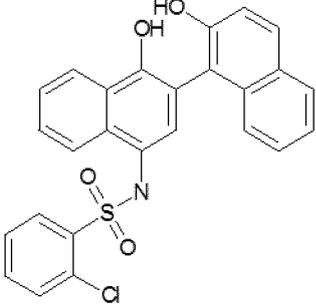
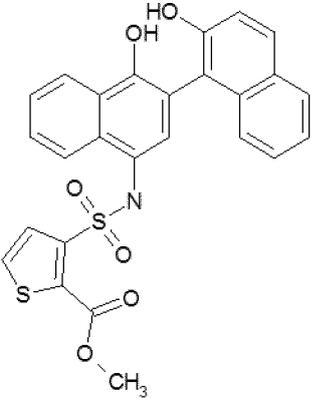
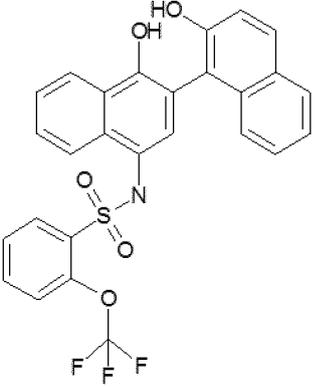
(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0066		C32H22ClNO5S	568,0528	8,67
F5749-0067		C33H25NO5S	547,6349	8,378
F5749-0068		C27H17ClF3NO4S	543,953	8,03176

(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0069		C32H23NO5S	533,6078	8,08
F5749-0070		C26H18BrNO4S	520,4057	7,266
F5749-0071		C26H18BrNO4S	520,4057	7,305
F5749-0072		C26H17BrFNO4S	538,3961	7,456

(continuación)

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN	Estructura	Estructura de la fórmula	PM	LogP
F5749-0073		C27H17BrF3NO4S	588,404	8,23776
F5749-0074		C26H18ClNO4S	475,9547	7,06
F5749-0075		C26H19NO6S2	505,5724	5,67
F5749-0076		C27H18F3NO5S	525,5074	7,86676

Ejemplo 11

UN PAPEL PARA LA SEÑALIZACIÓN DE STAT3 EN LA DESGRANULACIÓN DE LOS MASTOCITOS

Los pacientes con síndrome de hiper-IgE autosómico dominante (AD-HIES) portan mutaciones en STAT3 dominantes negativas, desarrollan infecciones frecuentes de la piel y los pulmones y también tienen una variedad de manifestaciones no inmunitarias que afectan a los huesos y al tejido conectivo. Además, casi todos tienen una erupción eccematosa presente muy temprano en la vida, así como los niveles de IgE en suero marcadamente elevados que dan nombre a la enfermedad. Cabe destacar que, un tercio de los pacientes de la población en general con dermatitis atópica desarrollan alergias alimentarias. A pesar de estas observaciones, la susceptibilidad de los pacientes con AD-HIES a alergias alimentarias específicas no se ha examinado cuidadosamente. Los inventores han encontrado que menos pacientes con AD-HIES desarrollan alergias alimentarias y anafilaxia que los pacientes con elevaciones marcadas de IgE y eccema sin mutaciones en STAT3. En realizaciones de la invención, esto se debe al menos en parte a los efectos de la señalización defectuosa de STAT3 en la desgranulación de los mastocitos.

Treinta y ocho por ciento de los pacientes mutantes de STAT3 tenían hipersensibilidad inmediata a los alimentos, significativamente menor que el 58,3 % observado en pacientes atópicos sin una mutación en STAT3 (FIG. 19A). Muchos menos pacientes con AD-HIES tuvieron anafilaxia a un alérgeno alimentario que los controles atópicos (8,5 % frente a 33,3 %) (FIG. 19B).

Asimismo, el silenciamiento de la expresión de STAT3 inhibió la desgranulación de los mastocitos después del entrecruzamiento de IgE en proporción directa al grado de silenciamiento de STAT3 en células LAD2 (FIG. 21). De manera similar, el silenciamiento de STAT3 en mastocitos humanos primarios conduce a una desgranulación de mastocitos mediada por IgE disminuida (FIG. 20B).

Ejemplo 12

EJEMPLOS DE COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE ANAFILAXIA

Una o más composiciones se caracterizan como tratamiento y/o prevención de anafilaxia usando medios convencionales en la técnica. En determinados casos, se emplea un modelo de anafilaxia en roedores para evaluar una o más composiciones de interés para determinar su eficacia en la anafilaxia. En al menos algunos aspectos, se utiliza una caída de temperatura en el roedor como medida de anafilaxia.

Ensayo de Anafilaxia Sistémica

Se puede emplear cualquier modelo de anafilaxia *in vivo* adecuado. Los ratones pueden estar sensibilizados (*iv*, por ejemplo) con una cantidad eficaz de IgE específica de DNP (H1-DNP-e-26) en un tampón apropiado y sometidos a prueba de provocación (*iv*, por ejemplo) después de una cantidad de tiempo apropiada (24 h, por ejemplo) con una cantidad eficaz de anti-IgE de ratón de rata.

Como alternativa, la anafilaxia puede inducirse por inyección (*iv*) del compuesto 48/80 (Sigma Aldrich) a una concentración subletal (por ejemplo, fueron letales concentraciones inferiores a 100 µg en 200 µl de tampón). Los transpondedores electrónicos implantables (Bio Medic Data Systems) se pueden insertar debajo de la piel dorsal de ratones anestesiados al menos 24 horas antes del inicio de los estudios de anafilaxia. Las temperaturas corporales basales antes de la inducción de anafilaxia y los cambios de temperatura durante la anafilaxia se pueden monitorizar usando un explorador electrónico (Bio Medic Data Systems).

Ensayo Terapéutico

En determinadas realizaciones, la composición a probar (por ejemplo, Cpd 188-9) se proporciona al individuo por un período de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días; la administración puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo intravenosa, subcutánea, aerosolización, inhalación, oral y así sucesivamente. Después de este período de tiempo, la anafilaxia puede inducirse en el sistema modelo.

La FIG. 22 demuestra un tratamiento eficaz en un modelo de anafilaxia usando Cpd188-9. Los ratones como modelo de anafilaxia se trataron previamente con 50 mg/kg de Cpd 188-9 o con vehículo durante una semana, después de lo cual se indujo anafilaxia a través de entrecruzamiento sistémico de IgE en el momento 0. Detectable dentro de al menos 40 minutos se produjo la inversión en la caída de temperatura, demostrando un uso eficaz en condiciones de anafilaxia.

La FIG. 23 ilustra la respuesta a la dosis usando diferentes ejemplos de dosis de Cpd188-9 en mastocitos humanos normales *in vitro*. La beta-hexosaminidasa (% de liberación) se utiliza como ejemplo de una medida de desgranulación de los mastocitos, que refleja la intensidad de la anafilaxia. Con cantidades crecientes de Cpd 188-9 administradas durante al menos tres días antes, se redujo la desgranulación de los mastocitos.

La FIG. 24 muestra que se evitó la anafilaxia sistémica *in vivo* con un inhibidor de STAT3 ejemplar. Se trataron previamente ratones sanos de tipo silvestre durante un día (panel superior) o una semana (panel inferior) con C188-9

a 50 mg/kg. Después los ratones se inyectaron con IgE específica para un antígeno y al día siguiente se inyectó el antígeno y se registró la caída de la temperatura corporal como una medida de anafilaxia. La inhibición de la caída se muestra solo en el panel inferior, cuando los ratones se trataron previamente (en rojo) durante una semana con C188-9.

5 La FIG. 25 demuestra que la filtración vascular periférica y central disminuye por Cpd 188-9. Los ratones se trataron previamente con C188-9 durante una semana como en la FIG. 24, después se les inyectó con un colorante para medir la inhibición por C188-9 de la filtración vascular mediada por IgE inducida localmente (arriba a la izquierda) o la filtración vascular inducida por el secretagogo C48/80 de mastocitos (arriba a la derecha) o la caída del hematocrito inducida por el factor activador de plaquetas, una medida de la filtración vascular (inferior).

15 La FIG. 26 ilustra que el efecto de Cpd188-9 no se debe a una disminución de la desgranulación de los mastocitos *in vivo*. Los niveles séricos de histamina y MCPT-1 se muestran a los 90 segundos (paneles izquierdos) o 30 minutos (paneles derechos) después de la prueba de provocación con Ag después de 1 semana de tratamiento con C188-9 como en la FIG. 24. No hubo diferencia estadística, lo que sugiere que la desgranulación de los mastocitos no fue un factor en la inhibición mediada por C188-9 en ratones.

20 La FIG. 27 demuestra el efecto de Cpd 188-9 en la desgranulación inducida por Ag en mastocitos murinos. El tratamiento previo de los mastocitos procedentes de médula ósea murina o mastocitos derivados de peritoneo con C188-9 no conduce a la inhibición de la desgranulación de los mastocitos, a diferencia de los mastocitos humanos como en la FIG. 23. Solo la incubación de mastocitos peritoneales de ratón con IL-6 (panel izquierdo) permite que C188-9 inhiba levemente los mastocitos.

25 La FIG. 28 muestra una representación esquemática del ensayo de permeabilidad transwell para medir la permeabilidad de las células endoteliales vasculares en respuesta a factores e inhibidores solubles.

30 La FIG. 29 demuestra la inhibición de la permeabilidad vascular de las células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC) por C188-9 tratadas previamente durante una semana +/- IL-6. Se utilizó DMSO como control para C188-9. El ensayo Transwell se realizó en respuesta a 100um de histamina. La inhibición máxima se observó con 1ug de C188-9 (a la derecha).

35 La FIG. 30 muestra que el ratón con síndrome de hiper-IgE es resistente a la anafilaxia (Siegel et al., JACI, 2013). La anafilaxia sistémica se induce como en la FIG. 24 en un modelo del síndrome de Hiper-IgE en ratones. Los ratones con mutaciones dominantes negativas en STAT3 fueron menos propensos a una caída de temperatura grave con la entrecruzamiento de IgE que los controles de camada.

40 La FIG. 31 demuestra HUVECS mutantes para STAT3 (HIES6) resisten a la permeabilidad inducida por histamina. Las células endoteliales de la vena umbilical humanas procedentes de pacientes con mutaciones dominantes negativas en STAT3 (HIES6) respondieron menos a la permeabilidad vascular inducida por histamina que los controles sanos (HUVECS marcadas). Esta es una evidencia directa de que la alteración de la señalización del STAT3 conduce a una alteración de las respuestas de permeabilidad vascular a la histamina.

45 Por lo tanto, el tratamiento previo con Cpd188-9 de 7 días (pero al menos en algunas condiciones, no una) inhibe la anafilaxia sistémica *in vivo*. En realizaciones específicas, la acción es mayor en las respuestas endoteliales vasculares a STAT3 que en mastocitos, mientras que los mastocitos humanos y las respuestas endoteliales se ven muy afectadas.

REFERENCIAS

50 Las citas completas de las referencias citadas en el presente documento se proporcionan en la siguiente lista.

PUBLICACIONES

Akira, S., 2000. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19:2607-2611.

55 Akira, S., 1997, IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1401-1418.

Akira, S., Isshiki,H., Sugita,T., Tanabe,O., Kinoshita,S., Nishio,Y., Nakajima,T., Hirano,T. y Kishimoto,T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9, 1897-1906.

60 Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernández, A., Morrison, S.J. y Clarke, M.F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983-3988.

Becker, S., Groner B, Muller CW (1998) Three-dimensional structure of the Stat3[beta] homodimer bound to DNA. *Nature* 394(6689): 145-151.

65 Bhasin, D., Cisek,K., Pandharkar,T., Regan,N., Li,C., Pandit,B., Lin,J. y Li,P.K. (2008). Design, synthesis, and

- studies of small molecule STAT3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 391-395.
- Brinkley, BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS et al. (1980) Variations in Cell Form and Cytoskeleton in Human Breast Carcinoma Cells *in Vitro*. *Cancer Res* 40(9): 3118-3129.
- 5 Bromberg, J., 2002. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109:1139-1142.
- Bromberg, J. y Darnell, J.E., Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19:2468-2473.
- 10 Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W. y Darnell, J.E., Jr. 1998. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 18:2553-2558.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C. y Darnell, J.E., Jr. 1999. Stat3 as an oncogene [published erratum appears in *Cell* 1999 Oct 15;99(2):239]. *Cell* 98:295-303.
- 15 Cailleau R OM, Crueiger QVJ. (1978) Long term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14: 911-915.
- 20 Caldenhoven, E., van, D.T.B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J.A.M., Lammers, J.W.J., Koenderman, L. y de, G.R.P. 1996. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *Journal of Biological Chemistry* 271:13221-13227.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., et al. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105-115.
- 25 Chakraborty, A., Dyer KF, Cascio M, Mietzner TA, Tweardy DJ (1999) Identification of a Novel Stat3 Recruitment and Activation Motif Within the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor. *Blood* 93(1): 15-24.
- 30 Chakraborty, A., White, S.M., Schaefer, T.S., Ball, E.D., Dyer, K.F. y Tweardy, D.J. 1996. Granulocyte colony-stimulating factor activation of Stat3 alpha and Stat3 beta in immature normal and leukemic human myeloid cells. *Blood* 88:2442-2449.
- 35 Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R. y Watson, C.J. 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* 13:2604-2616.
- Chen, X., Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE et al. (1998) Crystal Structure of a Tyrosine Phosphorylated STAT-1 Dimer Bound to DNA. *Cell* 93(5): 827-839.
- 40 Cohen, M.S., Zhang C, Shokat KM, Taunton J (2005) Structural Bioinformatics-Based Design of Selective, Irreversible Kinase Inhibitors. *Science* 308(5726): 1318-1321.
- 45 Coleman, DR, Ren Z, Mandal PK, Cameron AG, Dyer GA et al. (2005) Investigation of the Binding Determinants of Phosphopeptides Targeted to the Src Homology 2 Domain of the Signal Transducer and Activator of T ranscription 3. Development of a High-Affinity Peptide Inhibitor. *J Med Chem* 48(21): 6661-6670.
- Costa-Pereira, A.P., Tininini, S., Strobl, B., Alonzi, T., Schlaak, J.F., Is'harc, H., Gesualdo, I., Newman, S.J., Kerr, I.M. y Poli, V. 2002. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8043-8047.
- 50 Daling, J.R. y Malone, K.E. 2003. Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998. *J Clin Oncol* 21:28-34.
- 55 Darnell JE (2005), Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat Med* 11(6): 595-596.
- Dave, B., , y Chang, J. 2009. Treatment resistance in stem cells and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14:79-82.
- 60 Diaz, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E., et al. 2006. Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* 12:20-28.
- 65 Dong, S., Chen S-J, Tweardy DJ (2003) Cross-talk between Retinoic Acid and Stat3 Signaling Pathways in Acute Promyelocytic Leukemia. *Leuk Lymphoma* 44: 2023-2029.

- Dunn, GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11): 991-998.
- 5 Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. y Levy, D.E. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84:443-450.
- Eckert, H., Bajorath J (2007) Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. *Drug discovery today* 12(5-6): 225-233.
- 10 Epling-Burnette, P.K., Liu, J.H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J.M., Yang-Yen, H.F., Karras, J., et al. 2001. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 107:351-362.
- 15 Fiala, S., 1968. The cancer cell as a stem cell unable to differentiate. A theory of carcinogenesis. *Neoplasma* 15:607-622.
- Fu, X.-Y., Schindler, C, Improt, T., Aebersold, R. y Darnell, J.E., Jr. 1992. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:7840-7843.
- 20 Garcia, R. y Jove, R. 1998. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *Journal of Biomedical Science* In press.
- 25 Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL et al. (1997) Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 8(12): 1267-1276.
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S et al. (2001) Constitutive activation of Stat3 by the Src and Jak tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20: 2499-2513.
- 30 Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y. y Kim, J.D. 2000. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4227-4232.
- 35 Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., et al. 2006. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 12:11-19.
- 40 Haan, S., Hemmann, U., Hassiepen, U., Schaper, F., Schneider-Mergener, J., Wollmer, A., Heinrich, P.C. y Grotzinger, J. 1999. Characterization and binding specificity of the monomeric STAT3-SH2 domain. *J Biol Chem* 274:1342-1348.
- Huang, Y., Qiu J, Dong S, Redell MS, Poli V et al. (2007) Stat3 Isoforms, {alpha} and, Demonstrate Distinct Intracellular Dynamics with Prolonged Nuclear Retention of Stat3 Mapping to Its Unique C-terminal End. *J Biol Chem* 282(48): 34958-34967.
- 45 Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. y Thun, M.J. 2006. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56:106-130.
- 50 Jing, N., Tweardy DJ (2005) Targeting Stat3 in cancer therapy. *anticancer Drugs* 16(6): 601-607.
- Jing, N., Zhu Q, Yuan P, Li Y, Mao L et al. (2006) Targeting signal transducer and activator of transcription 3 with G-quartet oligonucleotides: a potential novel therapy for head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 5(2): 279-286.
- 55 Jing, N., Li Y, Xu X, Sha W, Li P et al. (2003) Targeting Stat3 with G-quartet oligodeoxynucleotides in human cancer cells. *DNA Cell Biol* 22(11): 685-696.
- Jing, N., Li, Y., Xiong, W., Sha, W., Jing, L. y Tweardy, D.J. 2004. G-quartet oligonucleotides: a new class of signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors that suppresses growth of prostate and breast tumors through induction of apoptosis. *Cancer Res* 64:6603-6609.
- 60 Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. y Schreiber, R.D. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7556-7561.
- 65 Kato, T., Sakamoto E, Kutsuna H, Kimura-Eto A, Hato F et al. (2004) Proteolytic Conversion of STAT3 {alpha} to

- STAT3(γ) in Human Neutrophils: ROLE OF GRANULE-DERIVED SERINE PROTEASES. *J Biol Chem* 279(30): 31076-31080.
- 5 Kim, J.K., Xu Y, Xu X, Keene DR, Gurusiddappa S et al. (2005) A Novel Binding Site in Collagen Type III for Integrins $\{\alpha\}_1\{\beta\}_1$ and $\{\alpha\}_2\{\beta\}_1$. *J Biol Chem* 280(37): 32512-32520.
- Kortylewski, M., Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S et al. (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 11(12): 1314-1321.
- 10 Leong, P.L., Andrews, G.A., Johnson, D.E., Dyer, K.F., Xi, S., Mai, J.C., Robbins, P.D., Gadiparthi, S., Burke, N.A., Watkins, S.F., et al. 2003. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4138-4143.
- 15 Li, C.I., Daling, J.R. y Malone, K.E. 2003. Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998. *J Clin Oncol* 21:28-34.
- Li, L. y Shaw, P.E. 2002. Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J Biol Chem* 277:17397-17405.
- 20 Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al. 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100:672-679.
- 25 Lin, Q., Lai R, Chirieac LR, Li C, Thomazy VA et al. (2005) Constitutive Activation of JAK3/STAT3 in Colon Carcinoma Tumors and Cell Lines: Inhibition of JAK3/STAT3 Signaling Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Colon Carcinoma Cells. *Am J Pathol* 167(4): 969-980.
- Maritano, D., Sugrue, M.L., Tininini, S., Dewilde, S., Strobl, B., Fu, X., Murray-Tait, V., Chiarle, R. y Poli, V. 2004. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* 5:401-409.
- 30 McMurray JS (2006), A New Small-Molecule Stat3 Inhibitor. *Chemistry & Biology* 13(11): 1123-1124.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., et al. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84:431-442.
- 35 Minino, A.M., Heron, M.P., Murphy, S.L. y Kochanek, K.D. 2007. Deaths: final data for 2004. *Natl Vital Stat Rep* 55:1-119.
- 40 Mora, L.B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., et al. 2002. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:6659-6666.
- 45 Neculai, D., Neculai AM, Verrier S, Straub K, Klumpp K et al. (2005) Structure of the Unphosphorylated STAT5a Dimer. *J Biol Chem* 280(49): 40782-40787.
- Nemethy, G., Gibson KD, Palmer KA, Yoon CN, Paterlini G et al. (1992) Energy Parameters in Polypeptides. 10. Improved Geometrical Parameters and Nonbonded Interactions for Use in the ECEPP/3 Algorithm, with Application to Proline-Containing Peptides. *JPhys Chem* 96: 6472-6484.
- 50 Park, O.K., Schaefer, T.S. y Nathans, D. 1996. *In vitro* activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13704-13708.
- 55 Park, O.K., Schaefer, L.K., Wang, W. y Schaefer, T.S. 2000. Dimer stability as a determinant of differential DNA binding activity of Stat3 isoforms. *J Biol Chem* 275:32244-32249.
- Qing, Y. y Stark, G.R. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* 279:41679-41685.
- 60 Ramana, C., Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark G (2000) Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19(21): 2619-2627.
- 65 Real, P.J., Sierra, A., De Juan, A., Segovia, J.C., Lopez-Vega, J.M. y Fernandez-Luna, J.L. 2002. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 21:7611-7618.

- Redell, MS, Tweardy DJ (2006) Targeting transcription factors in cancer: Challenges and evolving strategies. *Drug Discovery Today: Technologies* 3(3): 261-267.
- 5 Redell, M.S. y Tweardy, D.J. 2005. Targeting transcription factors for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 11:2873-2887.
- Ren, Z., Cabell, L.A., Schaefer, T.S. y McMurray, J.S. 2003. Identification of a high-affinity phosphopeptide inhibitor of stat3. *Bioorg Med Chem Lett* 13:633-636.
- 10 Ryan, J.J., McReynolds, L.J., Huang, H., Nelms, K. y Paul, W.E. 1998. Characterization of a mobile Stat6 activation motif in the human IL-4 receptor. *J Immunol* 161:1811-1821.
- Satya-Prakash KL PS, Hsu TC, Olive M, Cailleau R (1981) Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1q, 11q, and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer GenetCytogenet* 3: 61-73.
- 15 Schaefer, T.S., Sanders, L.K. y Nathans, D. 1995. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:9097-9101.
- Schindler, C. y Darnell, J.E., Jr. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. [Review]. *Annual Review of Biochemistry* 64:621-651.
- 20 Schindler, C., Fu, X.Y., Improt, T., Aebersold, R. y Darnell, J.E., Jr. 1992. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91-and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:7836-7839.
- 25 Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T.U. y Berg, T. (2006). Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem. Biol.* 13, 1235-1242.
- Shao, H., Cheng HY, Cook RG, Tweardy DJ (2003) Identification and Characterization of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Recruitment Sites within the Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Res* 63(14): 3923-3930.
- 30 Shao, H., Xu X, Jing N, Tweardy DJ (2006) Unique Structural Determinants for Stat3 Recruitment and Activation by the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor at Phosphotyrosine Ligands 704 and 744. *J Immunol* 176(5): 2933-2941.
- 35 Shao, H., Xu X, Mastrangelo M-AA, Jing N, Cook RG et al. (2004) Structural Requirements for Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Binding to Phosphotyrosine Ligands Containing the YXXQ Motif. *J Biol Chem* 279(18): 18967-18973.
- 40 Sharp, Z.D., Mancini MG, Hinojos CA, Dai F, Berno V et al. (2006) Estrogen-receptor- {alpha} exchange and chromatin dynamics are ligand- and domain-dependent. *J Cell Sci* 119(19): 4101-4116.
- Siddiquee, K., Zhang S, Guida WC, Blaskovich MA, Greedy B et al. (2007) Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(18): 7391-7396.
- 45 Siegel, et al. (2013) Diminished allergic disease in patients with STAT3 mutations reveals a role for STAT3 signaling in mast cell degranulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Dec;132(6): 1388-96.
- 50 Song, H., Wang R, Wang S, Lin J (2005) A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(13): 4700-4705.
- 55 Strecker, T.E., Shen, Q., Zhang, Y., Hill, J.L., Li, Y., Wang, C., Kim, H.T., Gilmer, T.M., Sexton, K.R., Hilsenbeck, S.G., et al. 2009. Effect of lapatinib on the development of estrogen receptor-negative mammary tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 101:107-113.
- 60 Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. y Akira, S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3801-3804.
- Totrov, M., Abagyan R (1997) *Proteins* 1: 215-220.
- Turkson, J., 2004. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 8:409-422.
- 65 Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P. y Jove, R. 1998. Stat3 activation by Src

- induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 18:2545-2552.
- 5 Turkson, J., Jove R (2000) STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19: 6613-6626.
- Turkson, J., Ryan, D., Kim, J.S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebti, S., Hamilton, A.D. y Jove, R. 2001. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* 276:45443-45455.
- 10 Turkson, J., Zhang, S., Palmer, J., Kay, H., Stanko, J., Mora, L.B., Sebti, S., Yu, H. y Jove, R. 2004. Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 3:1533-1542.
- 15 Twardy, DJ, Redell MS (2005) Targeting Transcription Factors for Cancer Therapy. *Curr Pharm Des* 11: 2873-2887.
- Twardy, DJ, Wright TM, Ziegler SF, Baumann H, Chakraborty A et al. (1995) Granulocyte colony-stimulating factor rapidly activates a distinct STAT-like protein in normal myeloid cells. *Blood* 86(12): 4409-4416.
- 20 Uddin, S., Hussain, A.R., Manogaran, P.S., Al-Hussein, K., Plataniias, L.C., Gutierrez, M.I. y Bhatia, K.G. 2005. Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma. *Oncogene* 24:7022-7030.
- Wiederkehr-Adam, M., Ernst, P., Muller, K., Bieck, E., Gombert, F.O., Ottl, J., Graff, P., Grossmuller, F. y Heim, M.H. 2003. Characterization of phosphopeptide motifs specific for the Src homology 2 domains of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3. *J Biol Chem* 278:16117-16128.
- 25 Xu, X., Kasembeli, M.M., Jiang, X., Twardy, B.J. y Twardy, D.J. 2009. Chemical probes that competitively and selectively inhibit Stat3 activation. *PLoS ONE* 4:e4783.
- 30 Yang, H., Mammen, J., Wei, W., Menconi, M., Evenson, A., Fareed, M., Petkova, V. y Hasselgren, P.O. (2005). Expression and activity of C/EBPbeta and delta are upregulated by dexamethasone in skeletal muscle. *J. Cell Physiol* 204, 219-226.
- Yoo, J.Y., Huso, D.L., Nathans, D. y Desiderio, S. 2002. Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell* 108:331-344.
- 35 Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.S., Jackson, P., Groopman, J.D., Manning, J.E., Harris, C.C. y Herman, J.G. 2001. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28:29-35.
- 40 Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J. y Jove, R. 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269:81-83.
- 45 Yu, H., Jove R (2004) The STATs of cancer- new molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer* 4(2): 97-105.
- Zhang RD FI, Price JE (1991) Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and brain metastasis. *Invasion Metastasis* 11: 204-215.
- 50 Zhu, Q., Jing N (2007) Computational study on mechanism of G-quartet oligonucleotide T40214 selectively targeting Stat3. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 21(10): 641-648.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método para prevenir o reducir el riesgo o la gravedad de la anafilaxia en un individuo,
- 5 en donde dicha composición se selecciona del grupo que consiste en N-(1',2'-dihidroxi-1,2'-binaftalen-4'-il)-4-metoxibencenosulfonamida, N-(3,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(4,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(5,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(6,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(7,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, N-(8,1'-Dihidroxi-[1,2']binaftalenil-4'-il)-4-metoxi-bencenosulfonamida, 4-Bromo-N-(1,6'-dihidroxi-[2,2']binaftalenil-4-il) -bencenosulfonamida y combinaciones de los mismos; y
- 10 en donde dicho método comprende la etapa de proporcionar al individuo una cantidad eficaz de una o más de dichas composiciones.
- 15
2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método comprende proporcionar la composición a dicho individuo en dosis múltiples, en donde preferentemente las dosis múltiples están separadas por minutos, horas, días o semanas.
- 20
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho individuo recibe una terapia adicional para la anafilaxia.
4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende N-(1',2'-dihidroxi-1,2'-binaftalen-4'-il)-4-metoxibencenosulfonamida.
- 25
5. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición inhibe Stat3, Stat1 o ambos.
6. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en dicho método la composición se proporciona a dicho individuo antes de la exposición o después de la exposición a al menos un alérgeno que induce la anafilaxia.
- 30
7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde en dicho método la composición se proporciona a dicho individuo al menos 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas; o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días; o al menos 1, 2, 3 o 4 semanas antes o después de la exposición a al menos un alérgeno que induce la anafilaxia.
- 35
8. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho alérgeno es un alérgeno alimentario, en donde preferentemente el alérgeno alimentario es uno o más alérgenos alimentarios seleccionados del grupo que consiste en leche, legumbres, marisco, frutos secos, huevos, pescado, soja y trigo.
- 40
9. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho alérgeno es un alérgeno ambiental o alérgeno estacional, en donde preferentemente el alérgeno ambiental o el alérgeno estacional es polen o moho.
- 45
10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho alérgeno es un alérgeno de veneno, en donde preferentemente el alérgeno de veneno es de un organismo seleccionado del grupo que consiste en avispa, abeja, hormiga, avispon, chaqueta amarilla y áspid.
- 50
11. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho alérgeno es un alérgeno de medicamento, en donde preferentemente el alérgeno de medicamento se selecciona del grupo que consiste en anestésicos, antibióticos de β -lactamas, aspirina, fármaco antiinflamatorio no esteroideo, quimioterapia, vacuna, preparaciones de protamina y de hierbas.
- 55
12. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el alérgeno es látex.
13. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método comprende además la etapa de diagnosticar la anafilaxia.
- 60
14. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en dicho método la composición se suministra por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, sublingual, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada, mediante un catéter, mediante un lavado, en composiciones lipídicas, en composiciones de liposomas o como un aerosol.
- 65

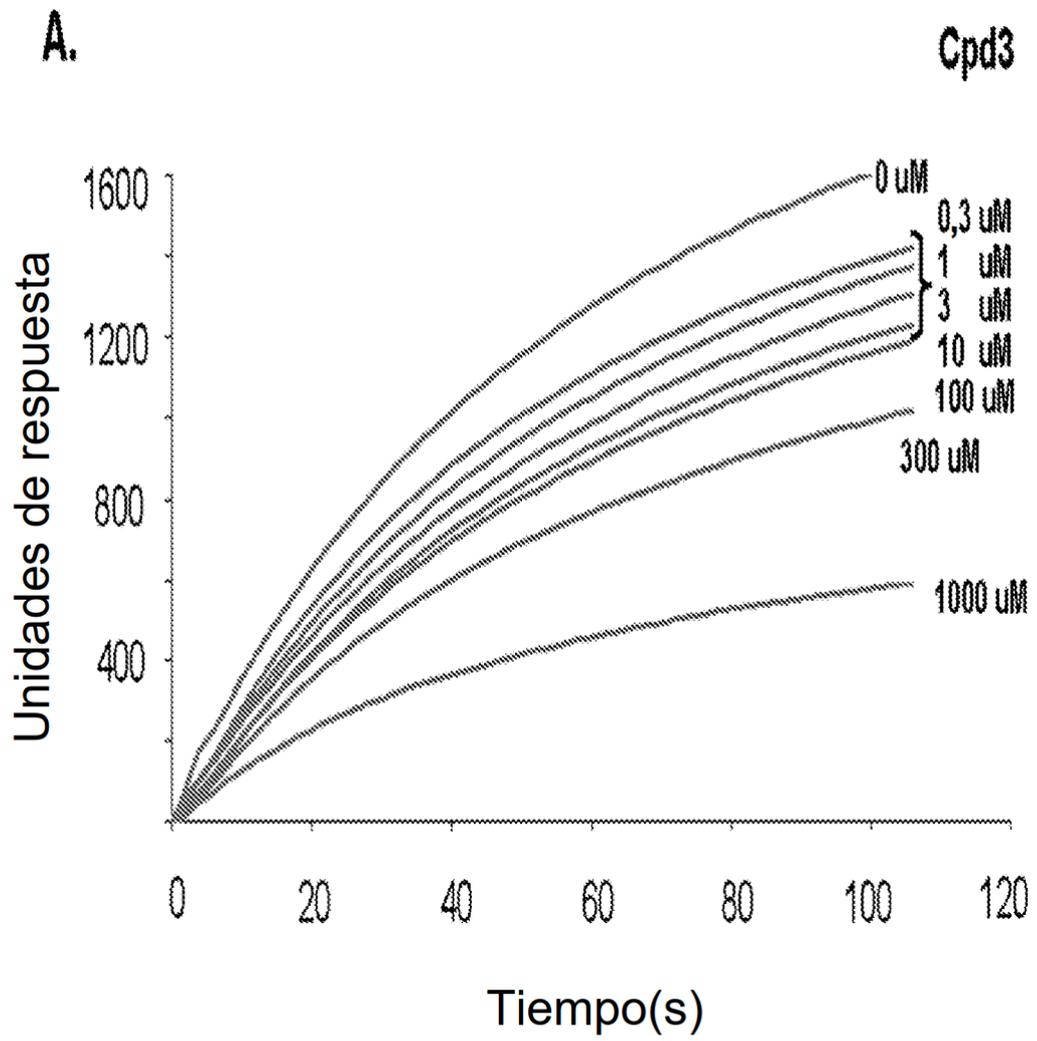


FIG. 1

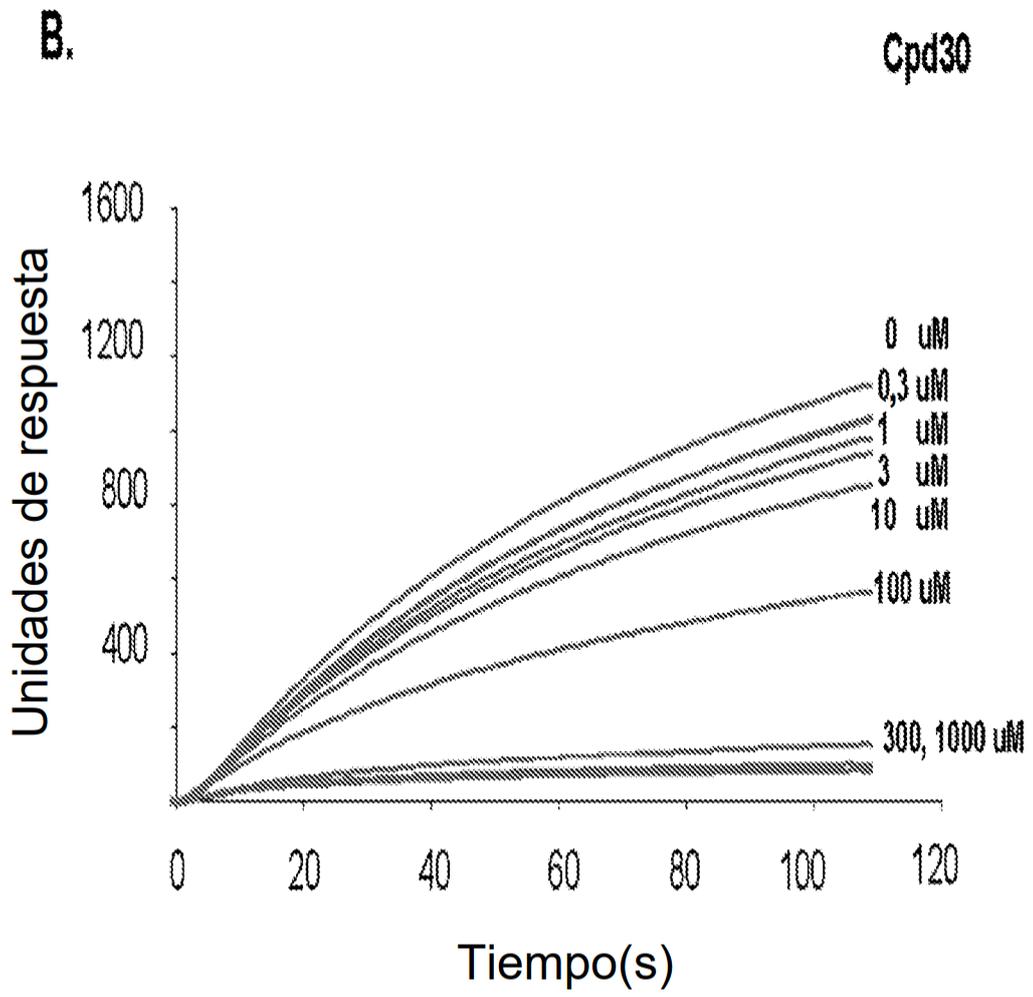


FIG. 1

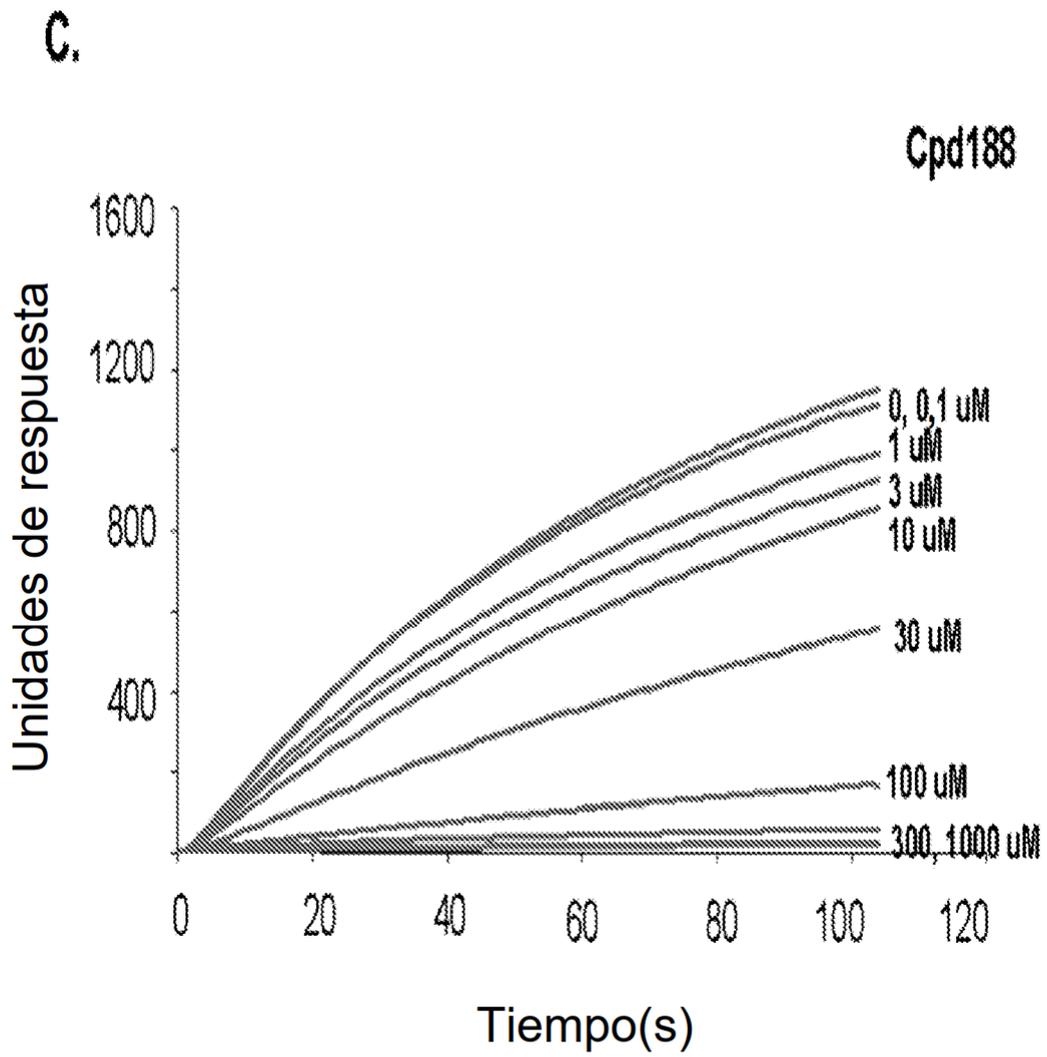


FIG. 1

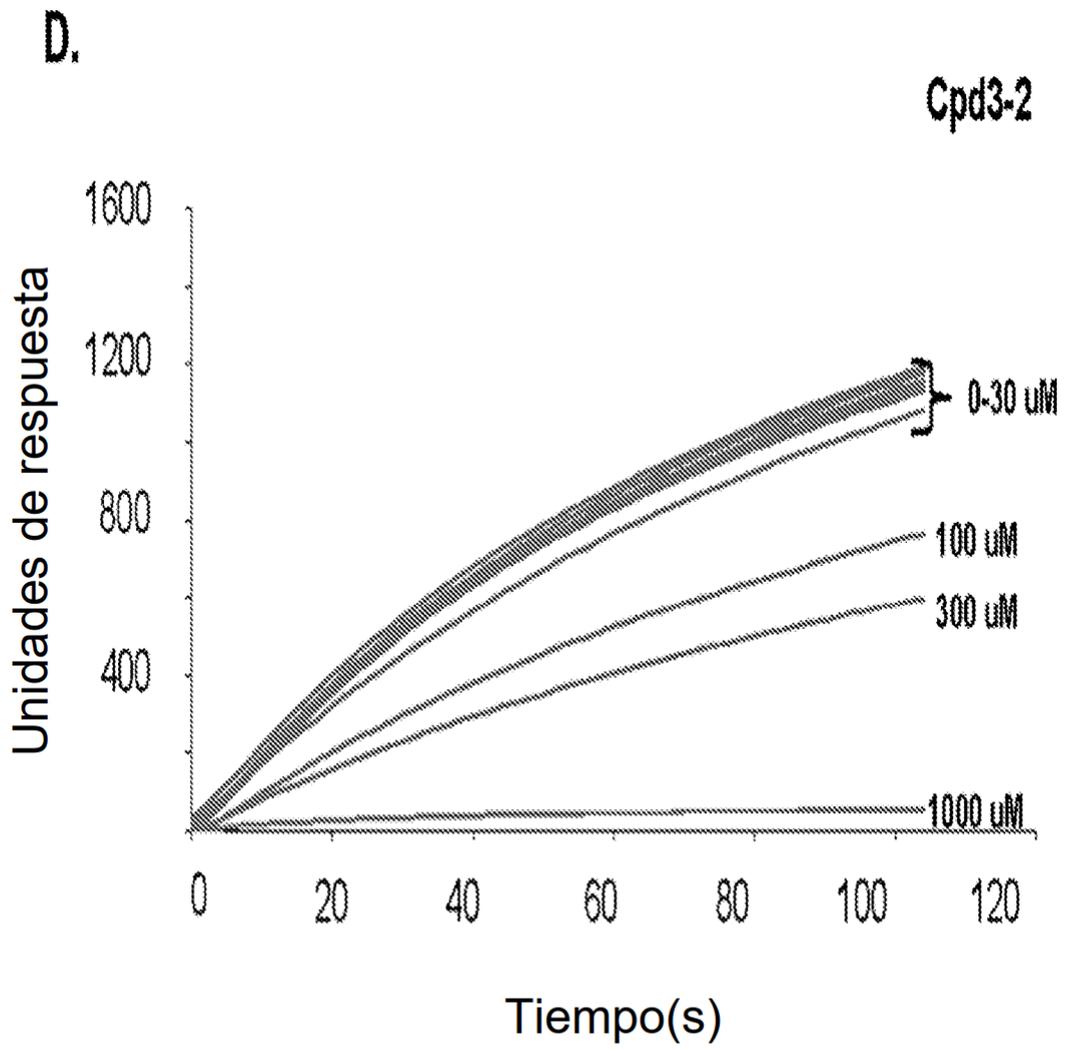


FIG. 1

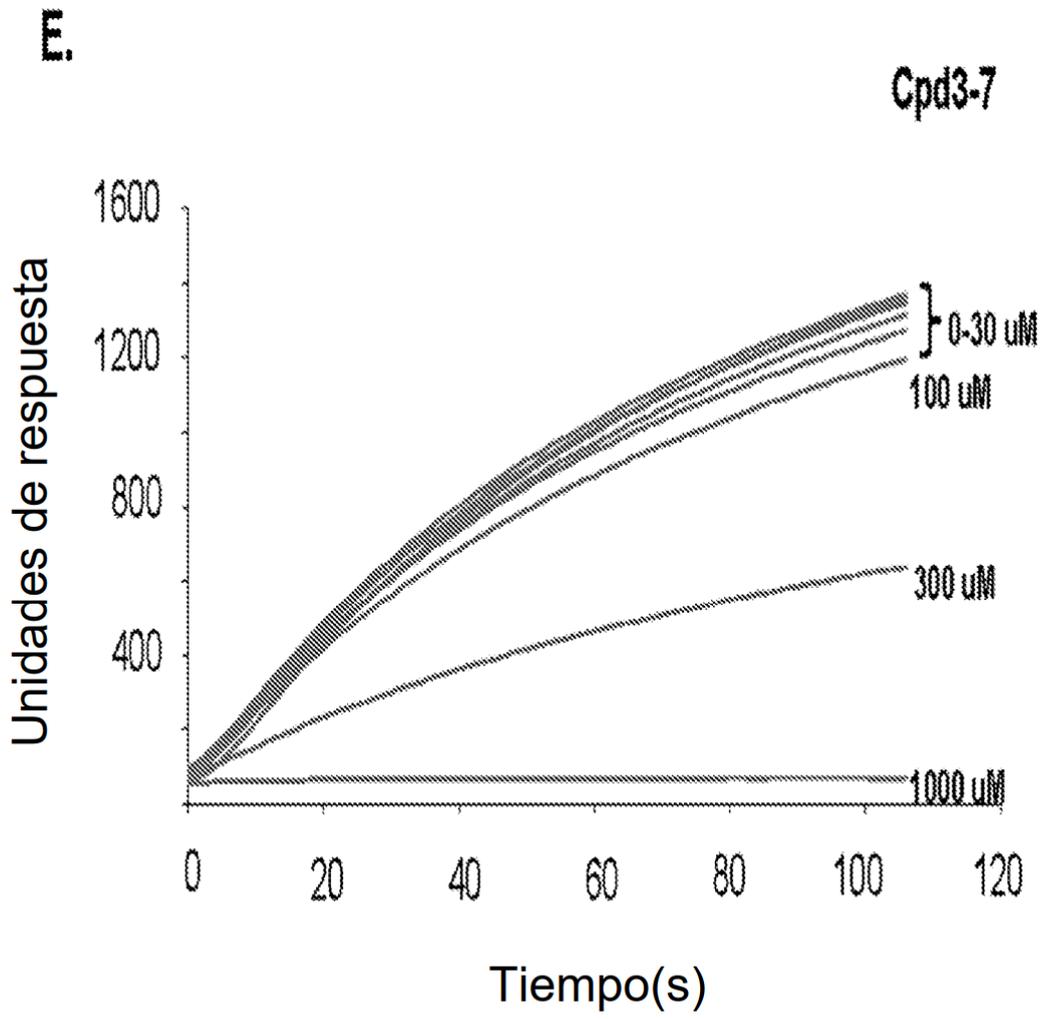


FIG. 1

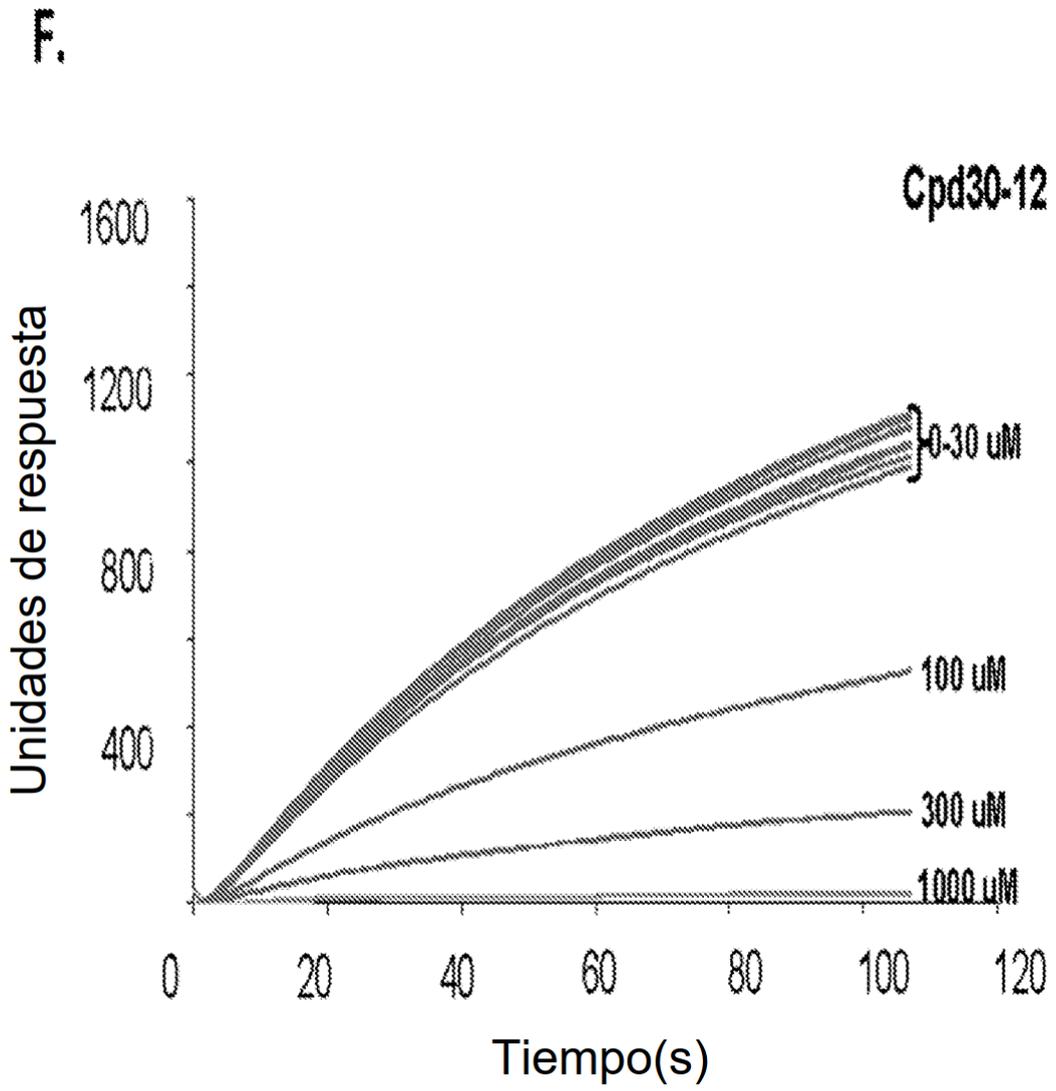


FIG. 1

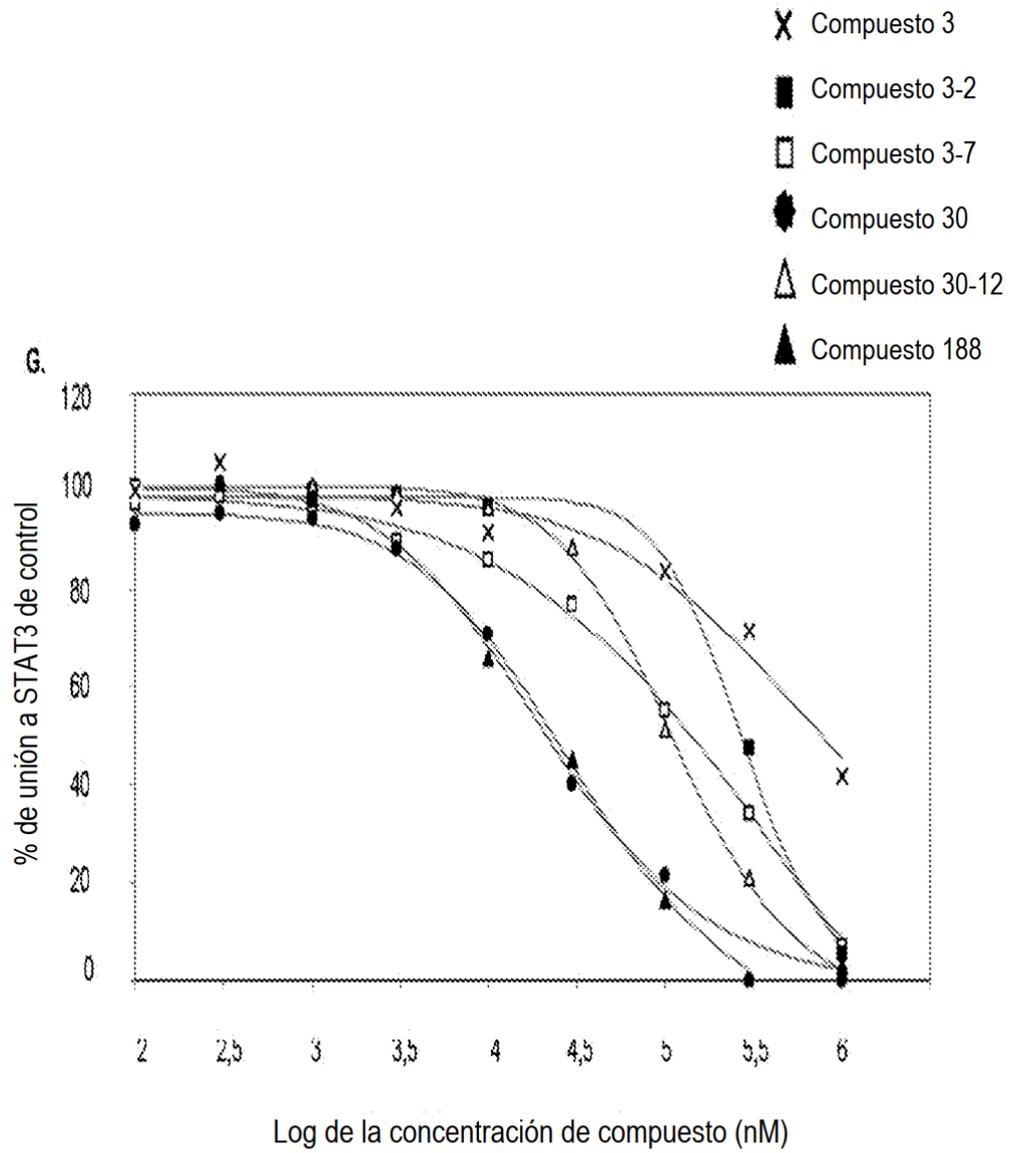


FIG. 1

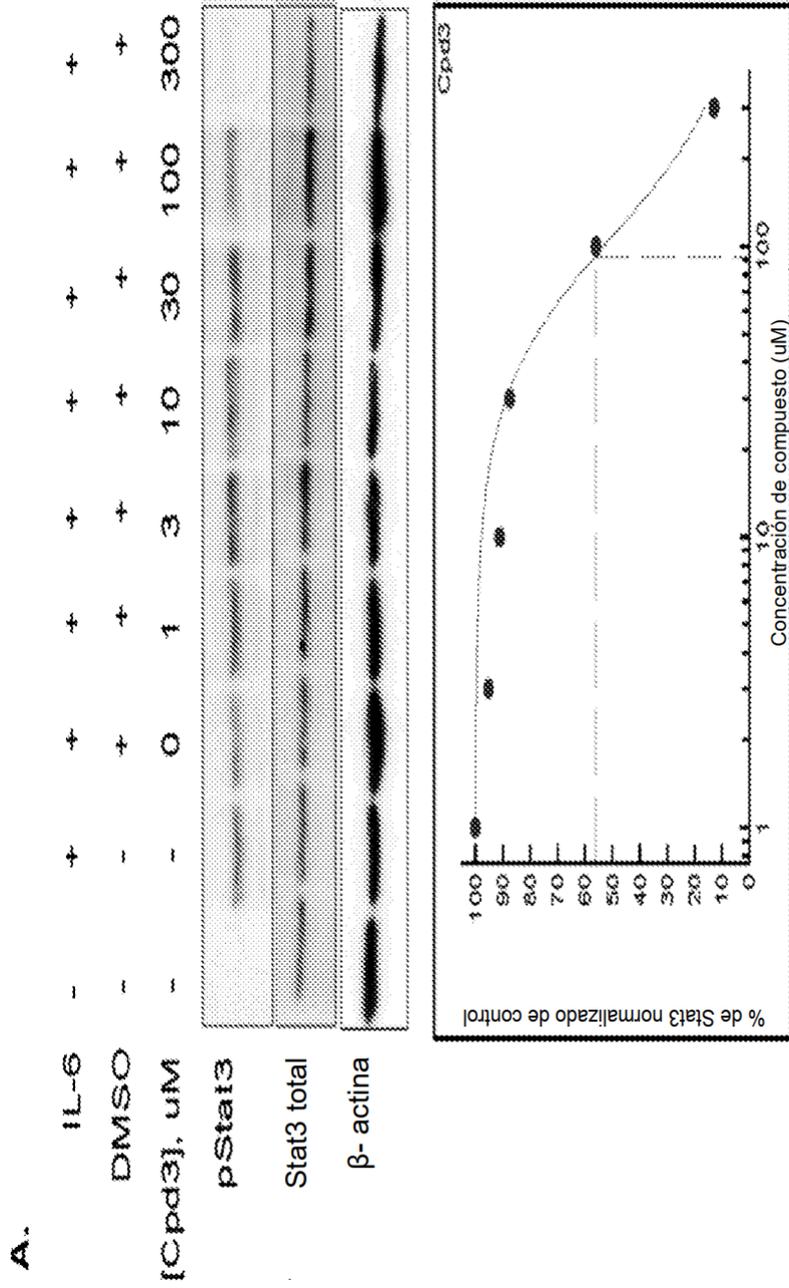


FIG. 2

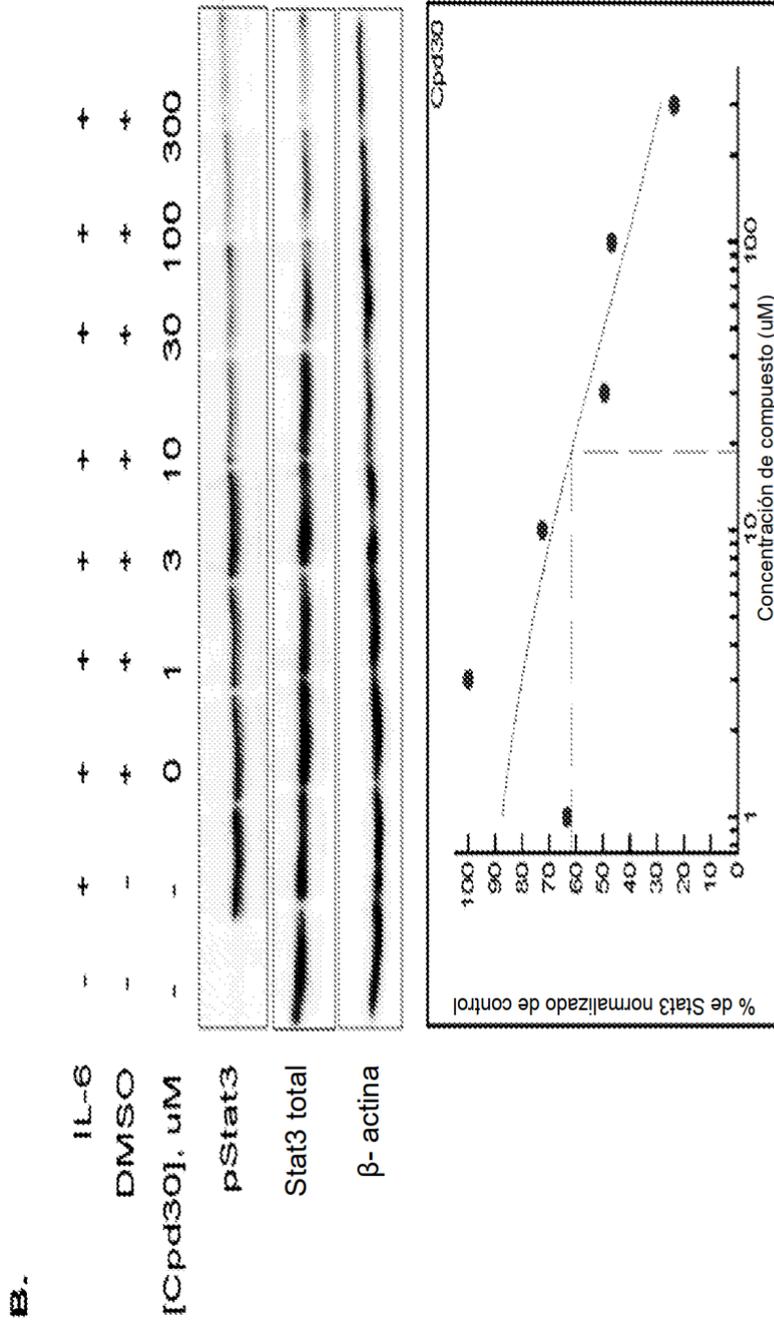


FIG. 2

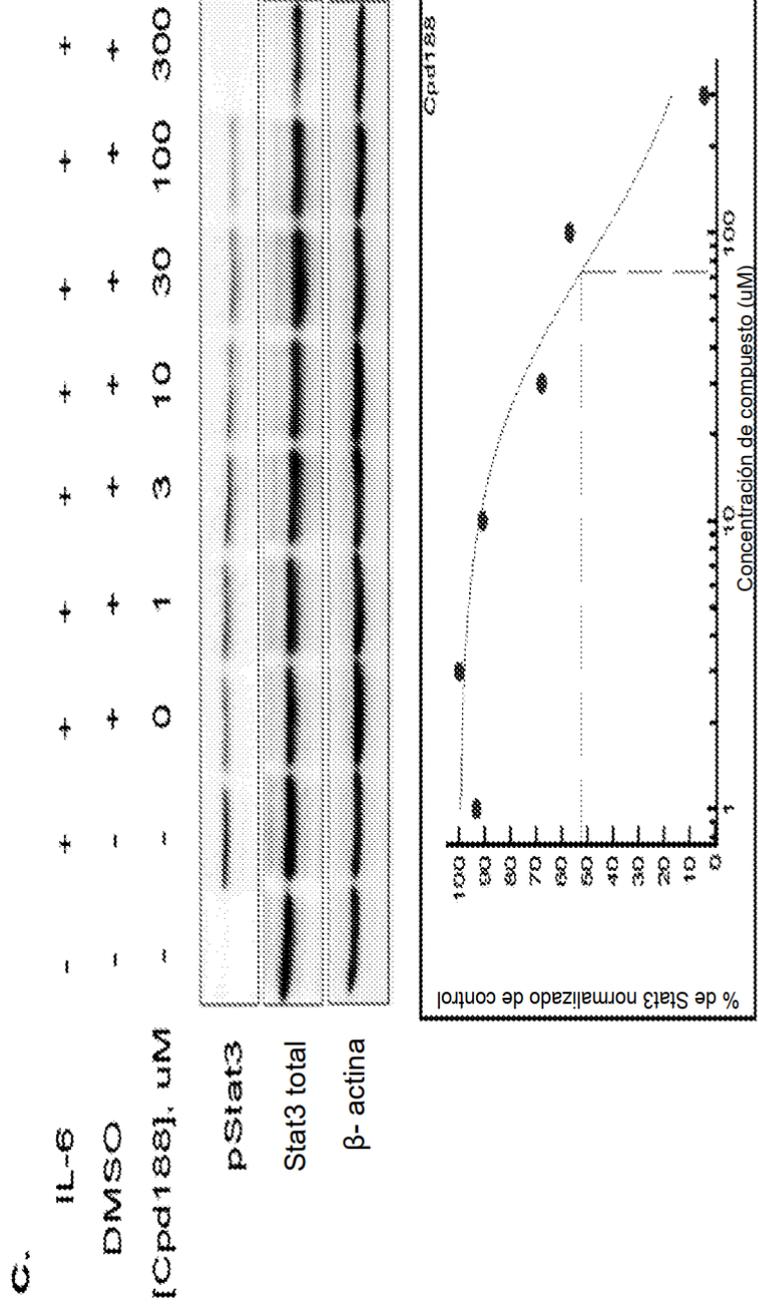


FIG. 2

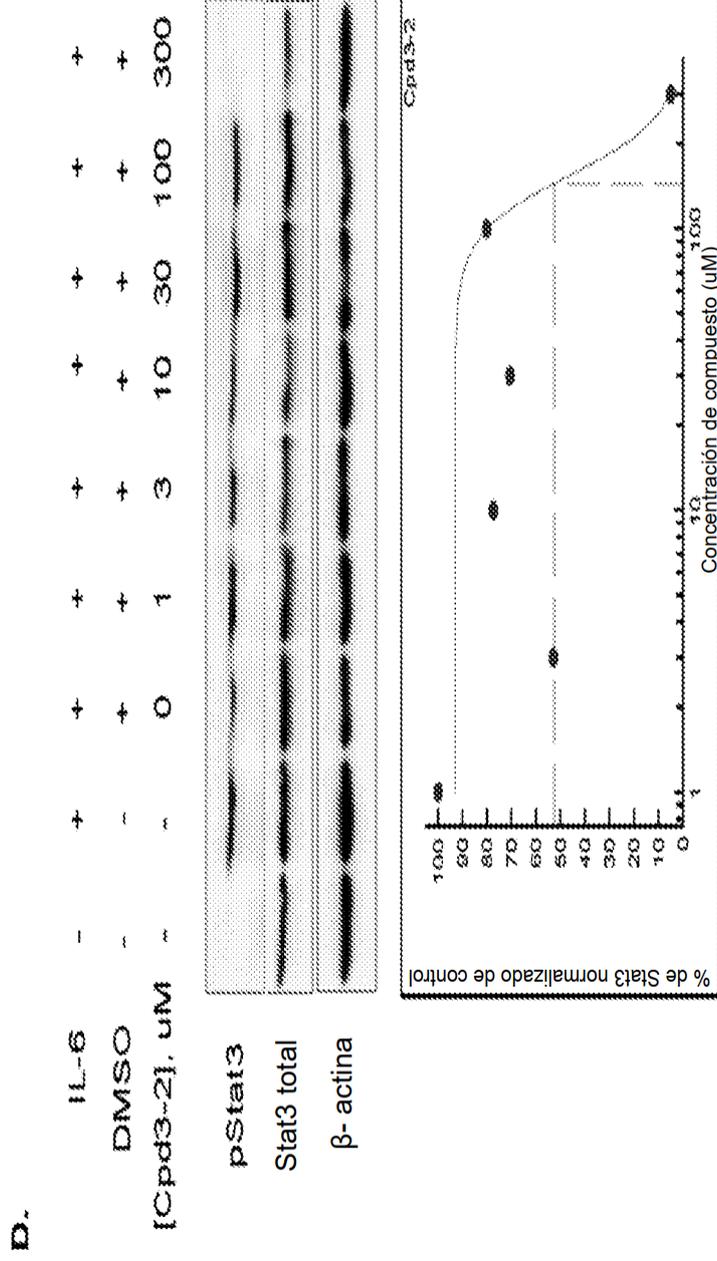


FIG. 2

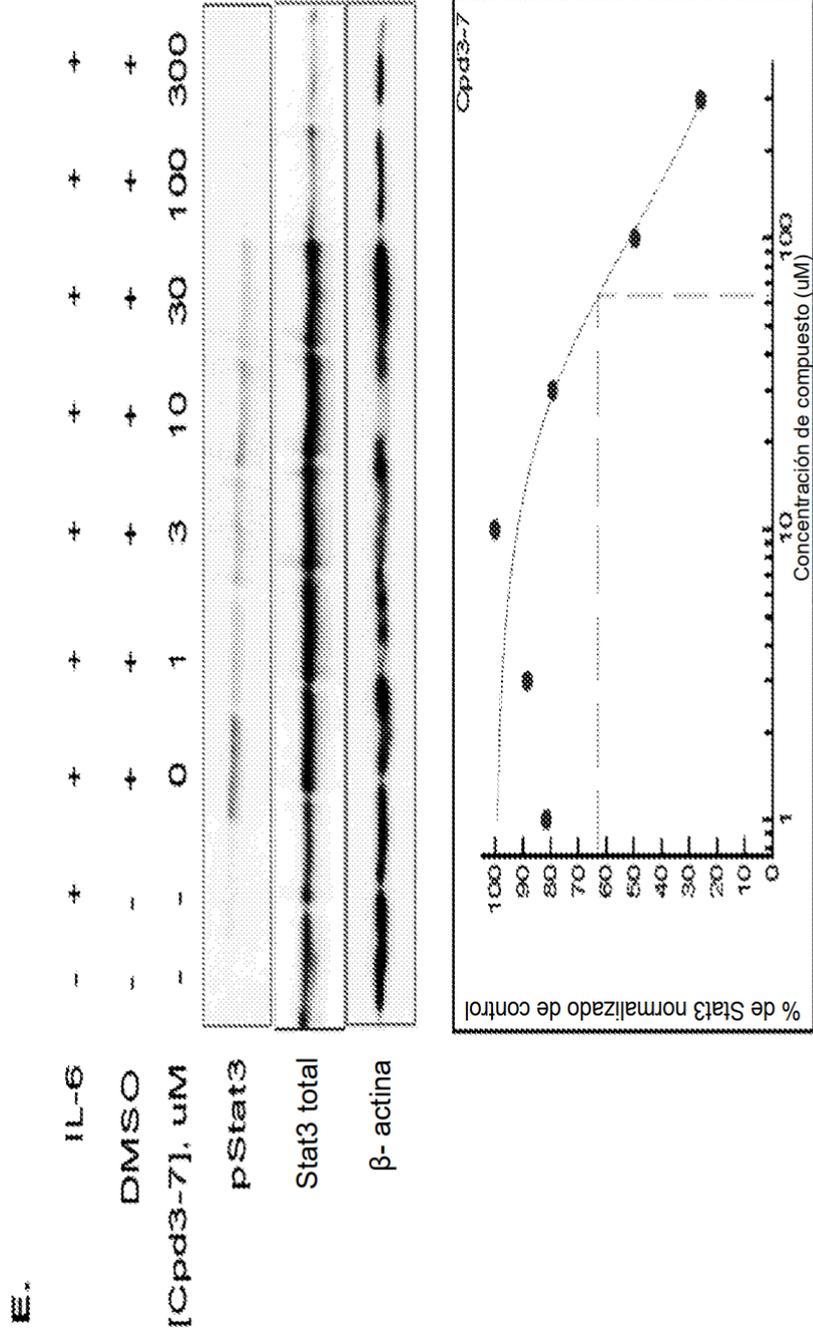


FIG. 2

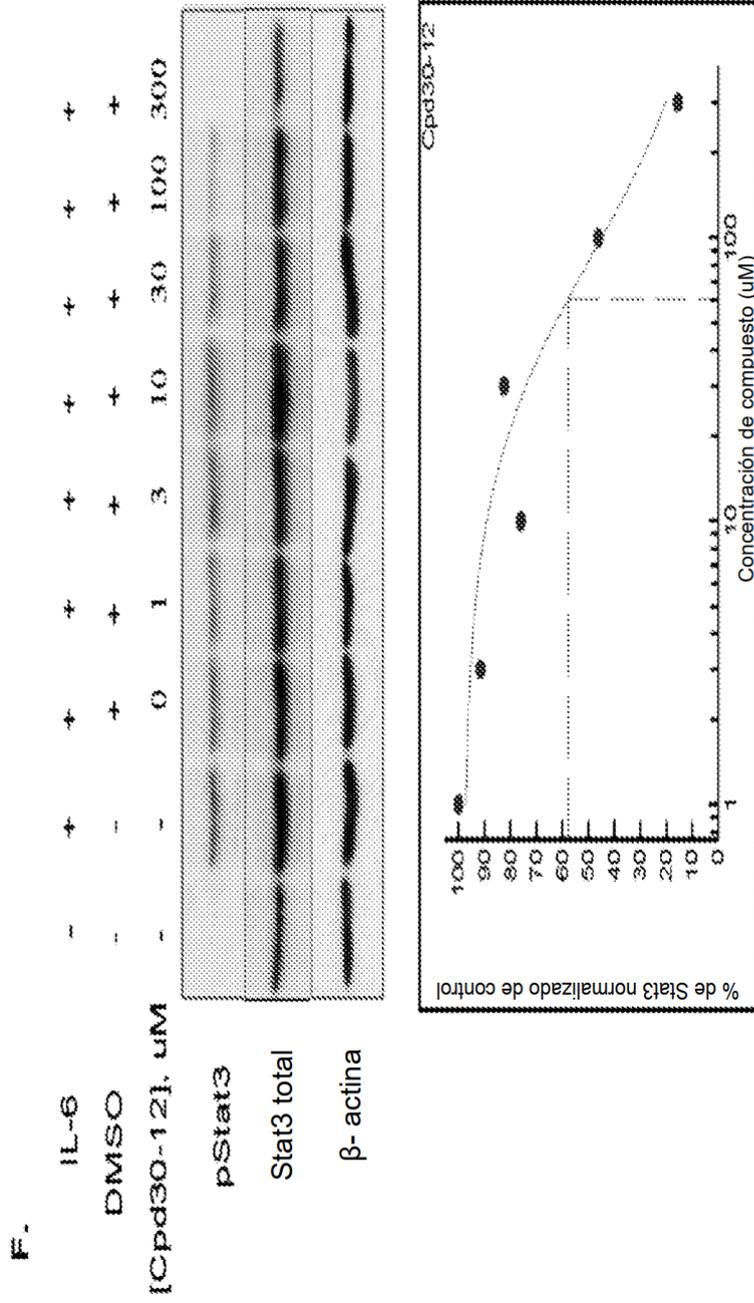
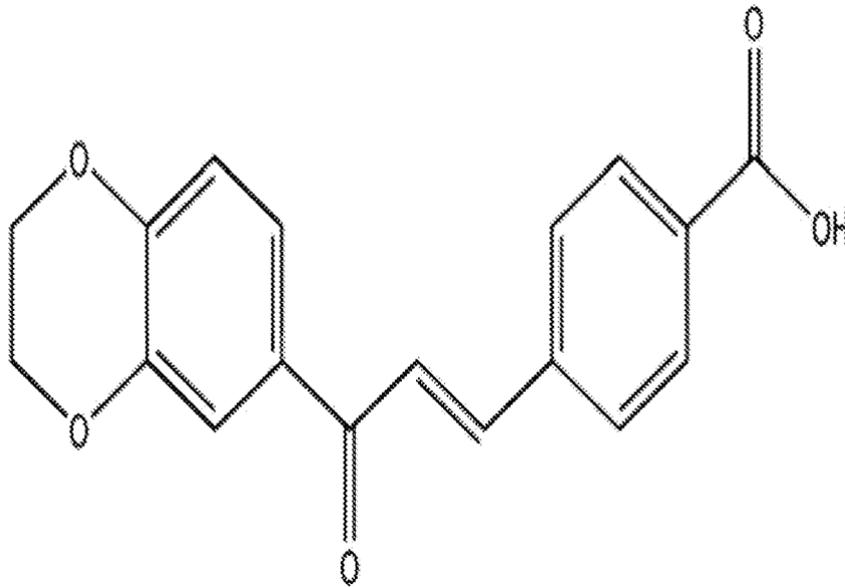


FIG. 2

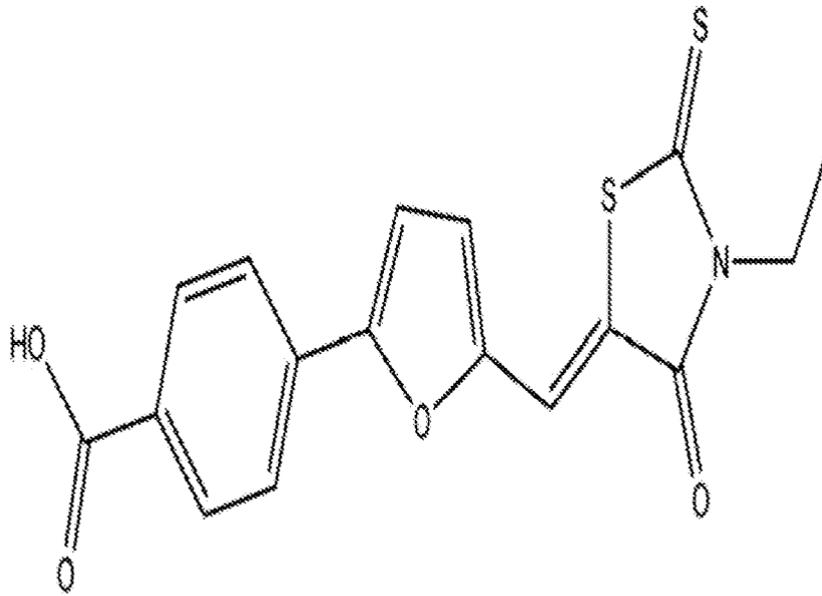
A. Cpd3



ácido 4-[3-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-3-oxo-1-propen-1-il]
benzoico

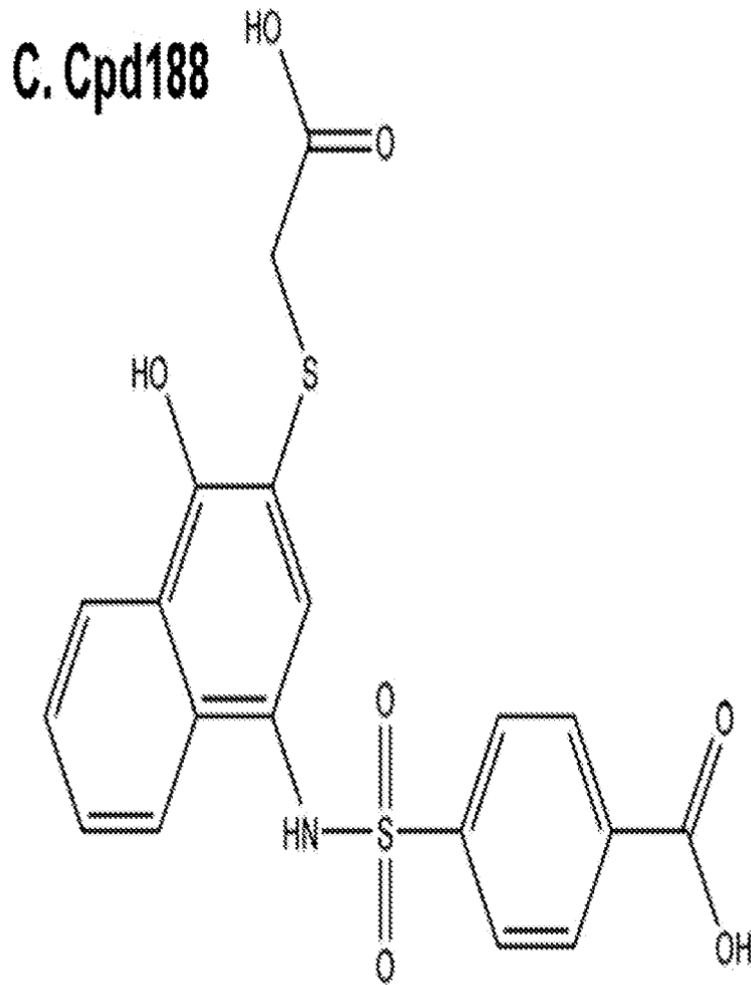
FIG. 3

B. Cpd30



ácido 4{5-[(3-etil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-iliden)metil]-2-furil}
benzoico

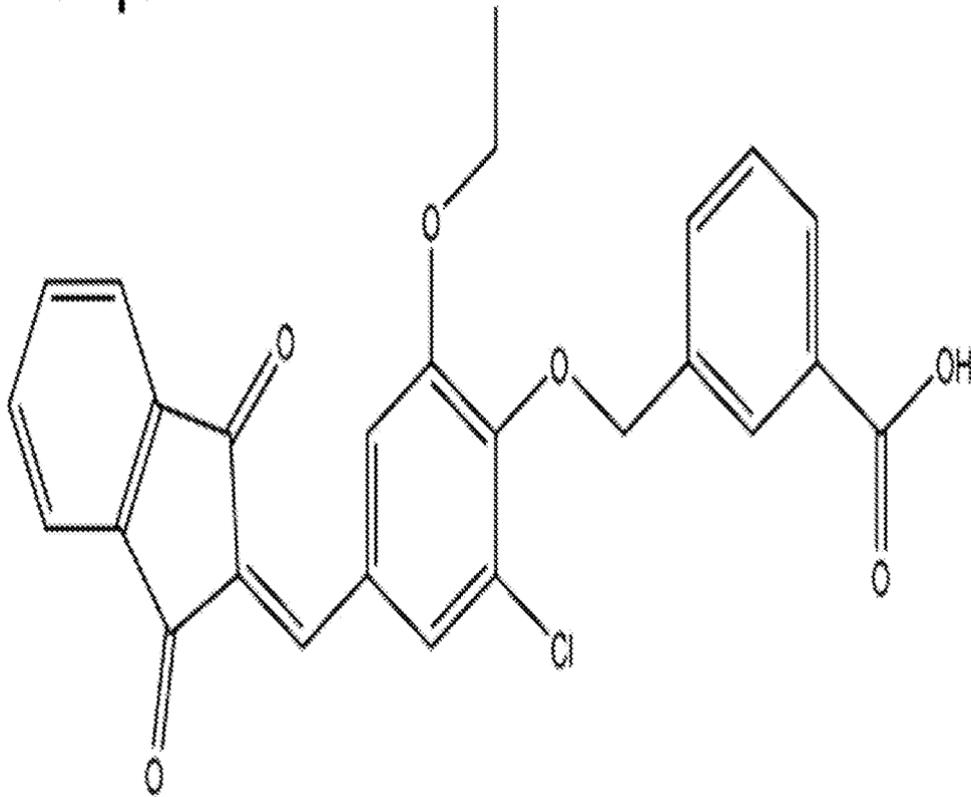
FIG. 3



ácido 4-[(3-[(3-[carboximetil]tio]-4-hidroxi-1-naftil)amino)sulfonyl] benzoico

FIG. 3

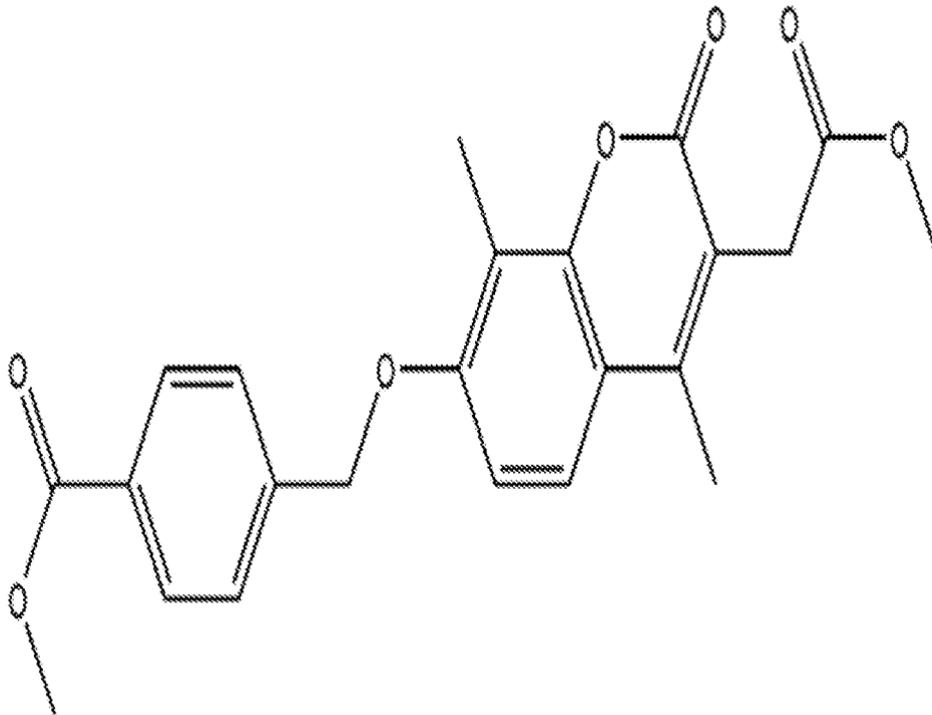
D. Cpd3-2



ácido 3-({2-cloro-4-[(1,3.dioso-1,3-dihidro-2H-inden-2-iliden)metil]-6-
etoxifenoxi}metil) benzoico

FIG. 3

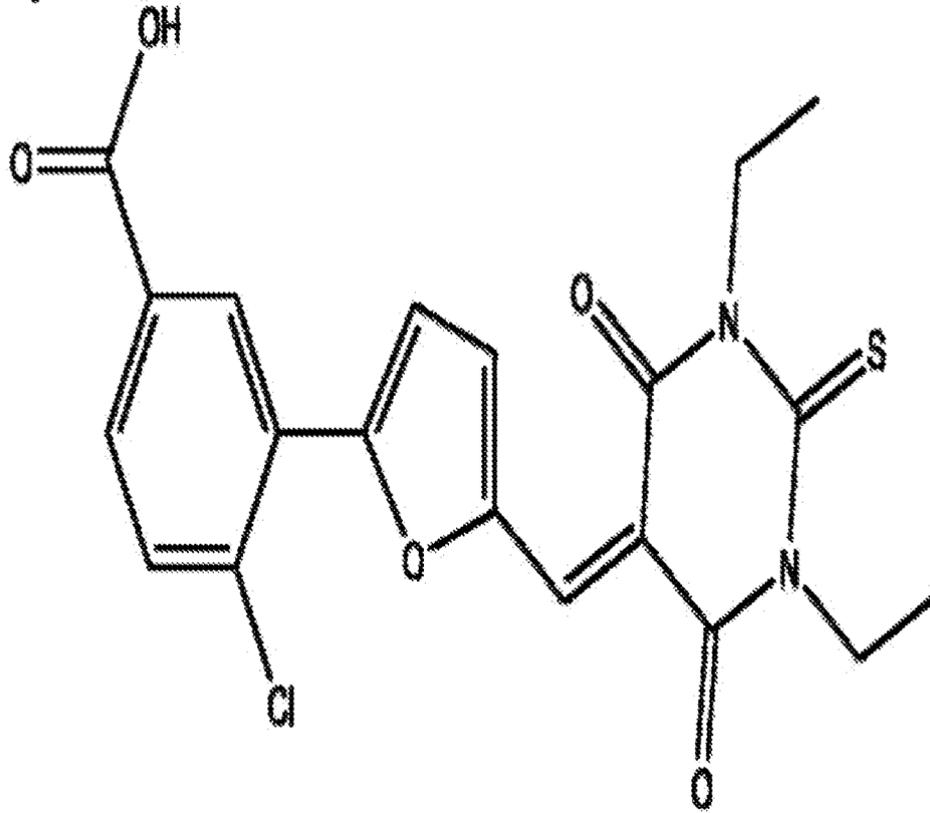
E. Cpd3-7



metil 4-([3-(2-metoxi-2-oxoetil)-4,8-dimetil-2-oxo-2H-cromen-7-il]oxi)metil) benzoato

FIG. 3

F. Cpd30-12



ácido 4-cloro-3-{5-[1,3-dietil-4,5-dioxo-2-tioxotetrahidro-5(2H)-
pirimidiniliden)metil]-2-furil} benzoico

FIG. 3

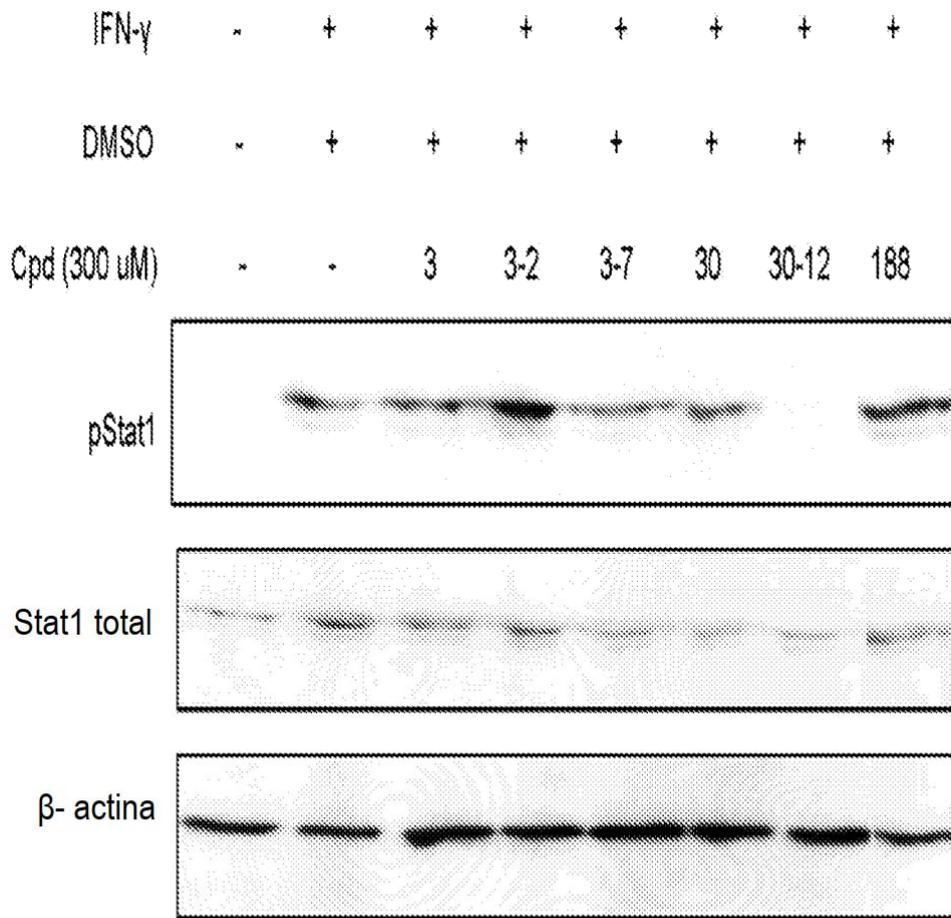


FIG. 4

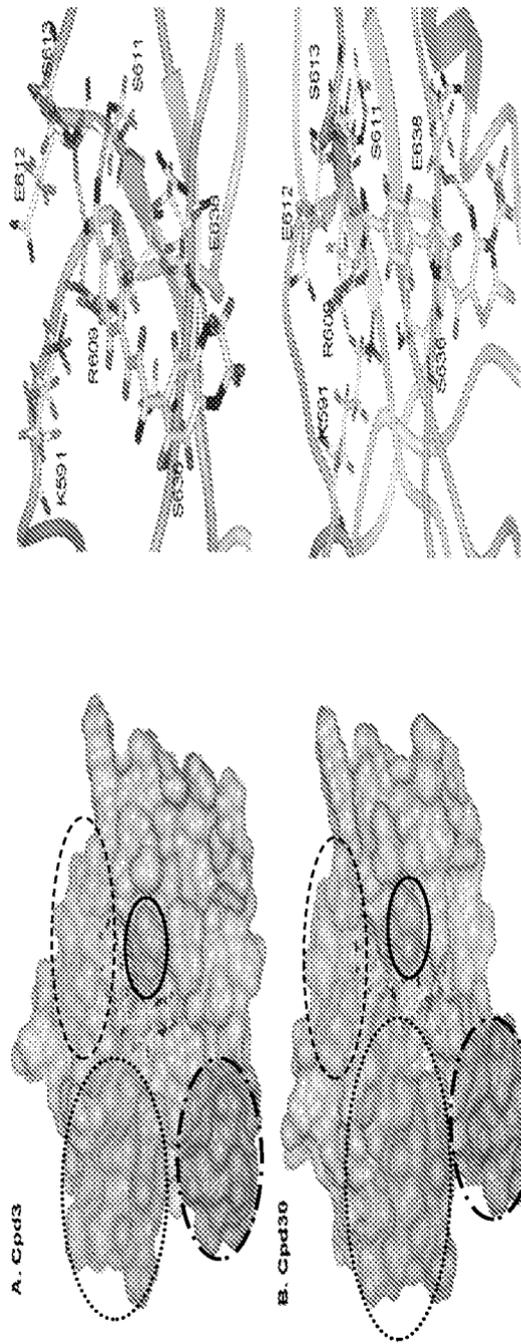


FIG. 6

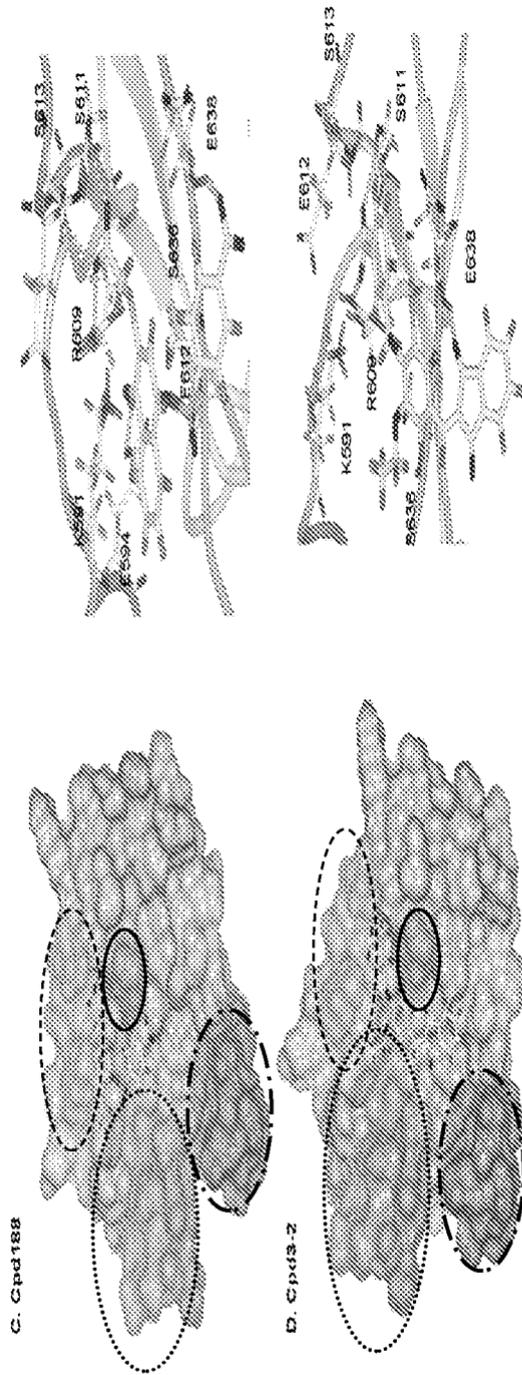


FIG. 6

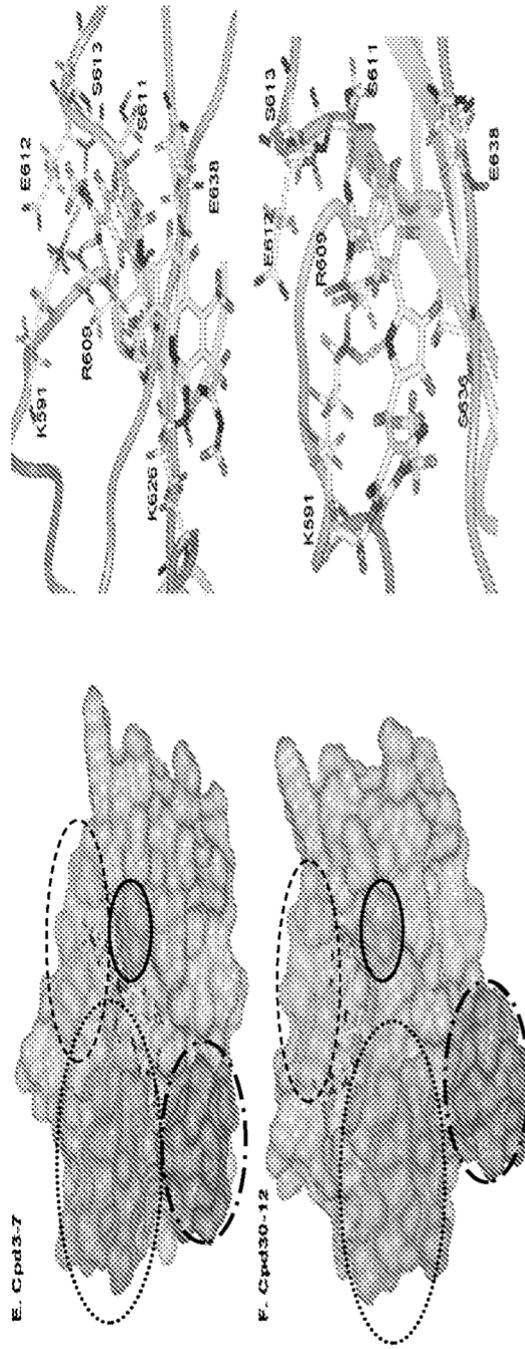


FIG. 6

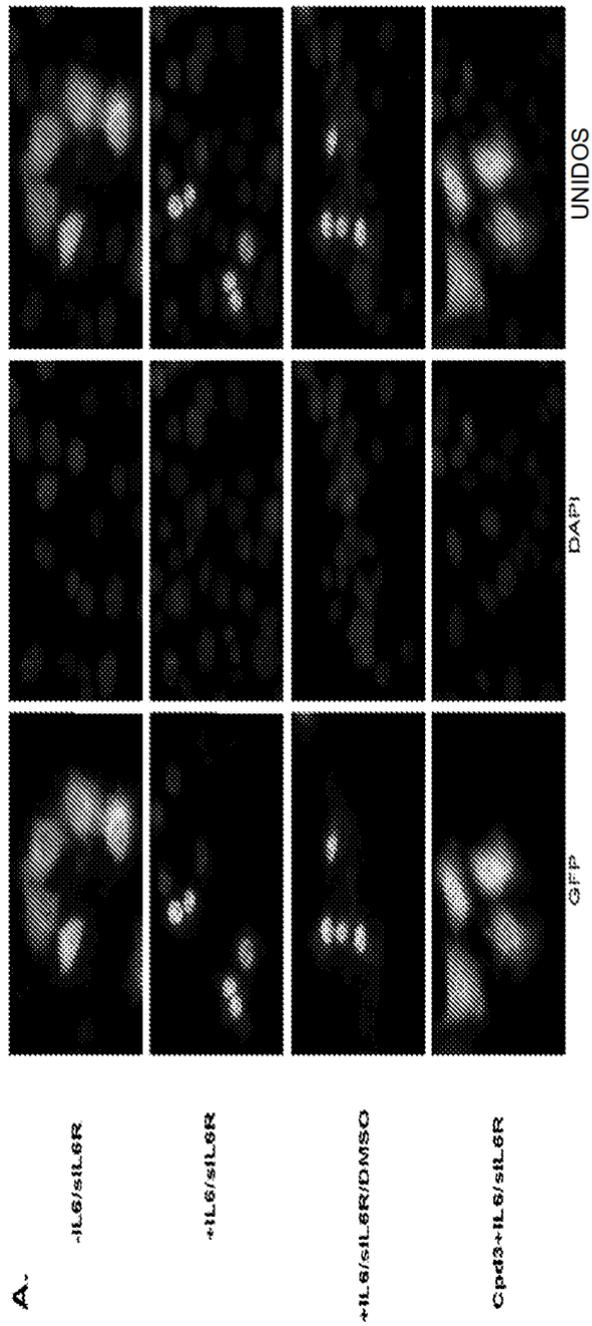


FIG. 7

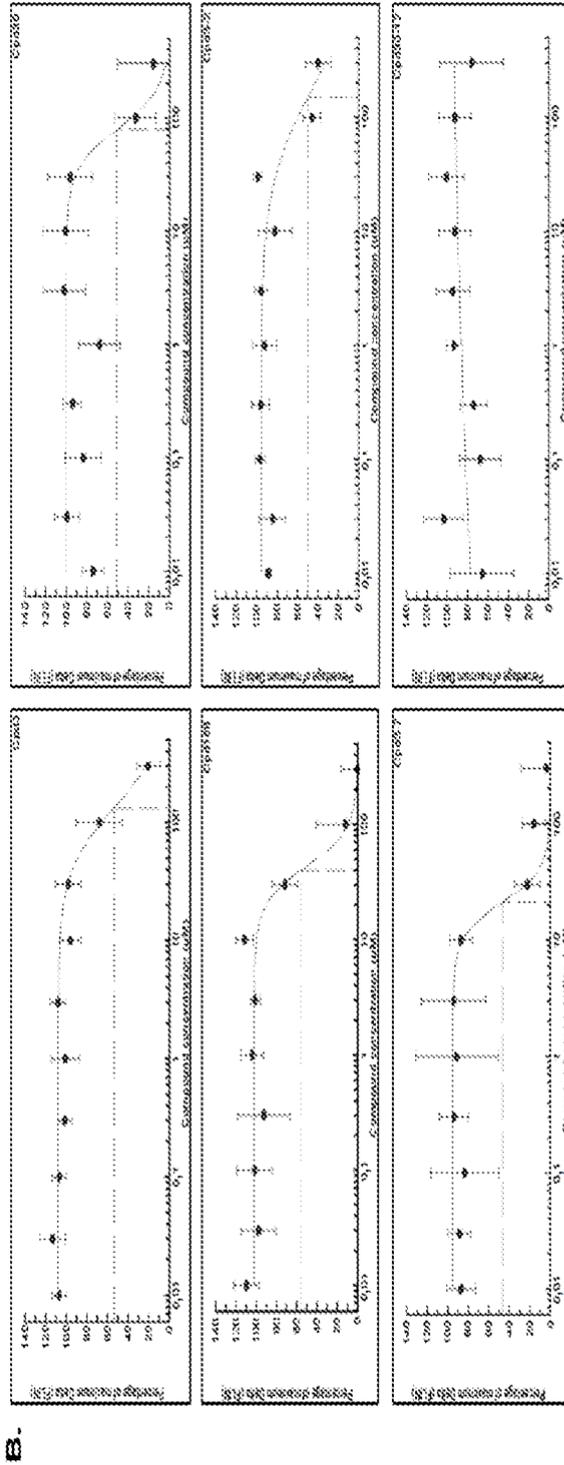


FIG. 7

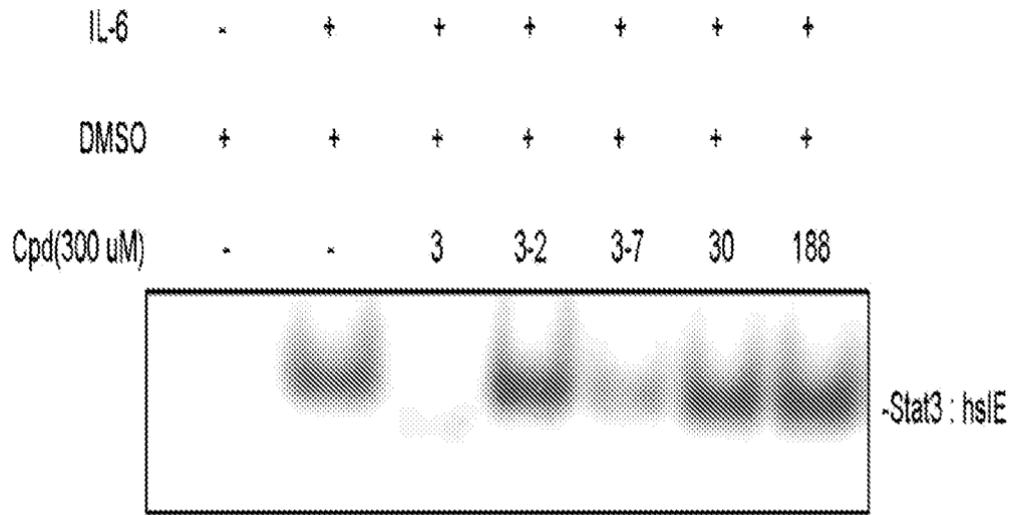


FIG. 8

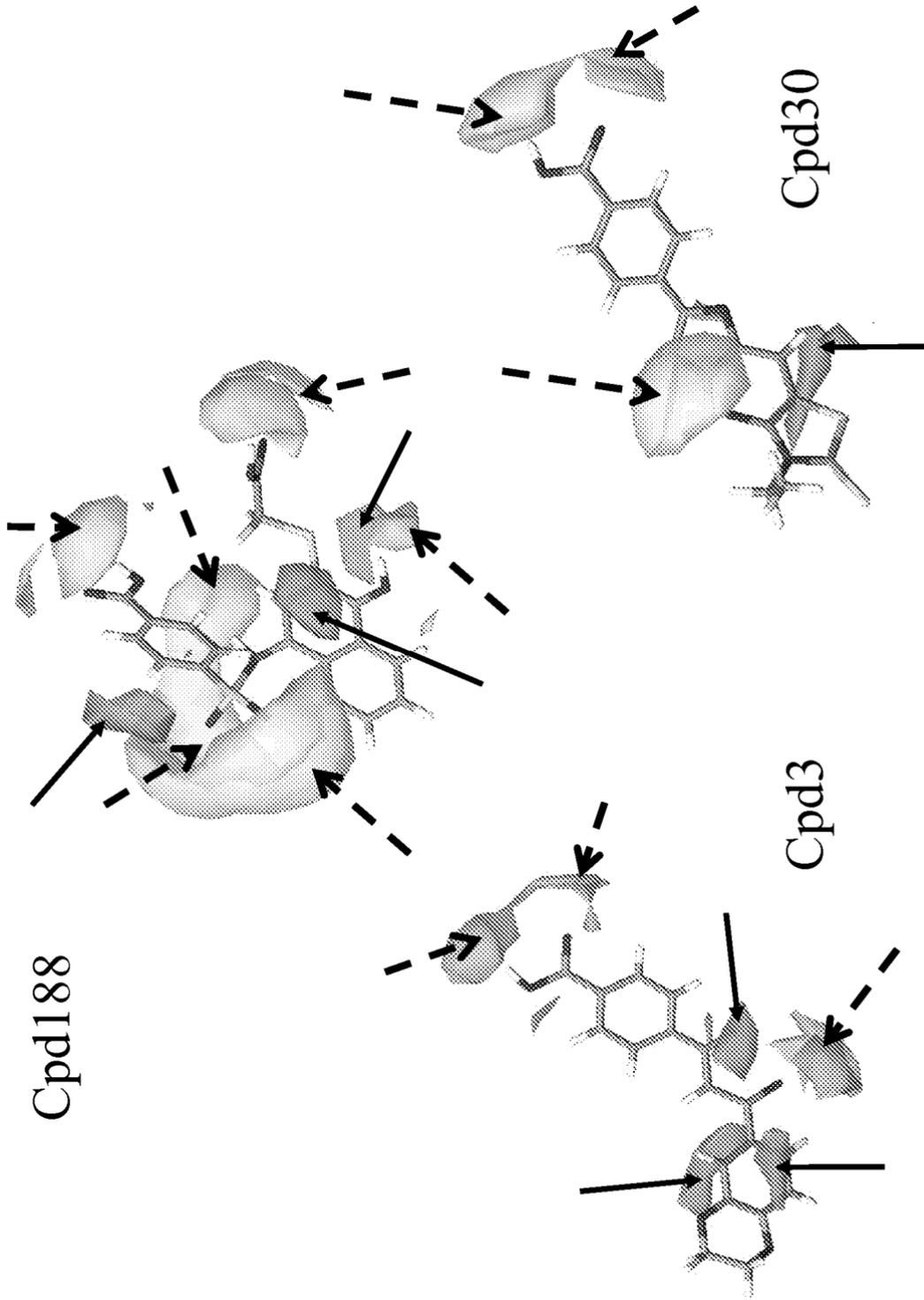


FIG. 9

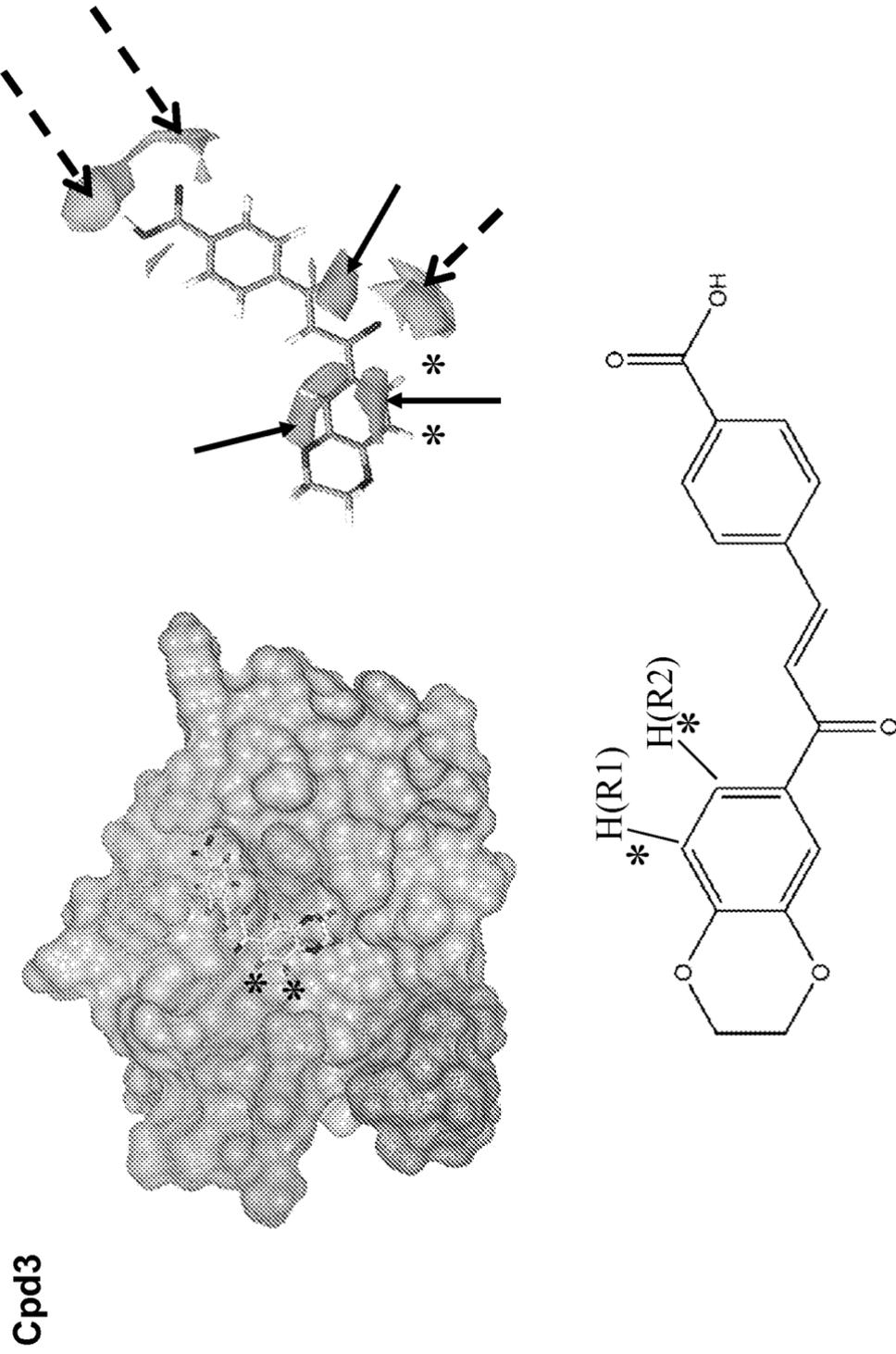
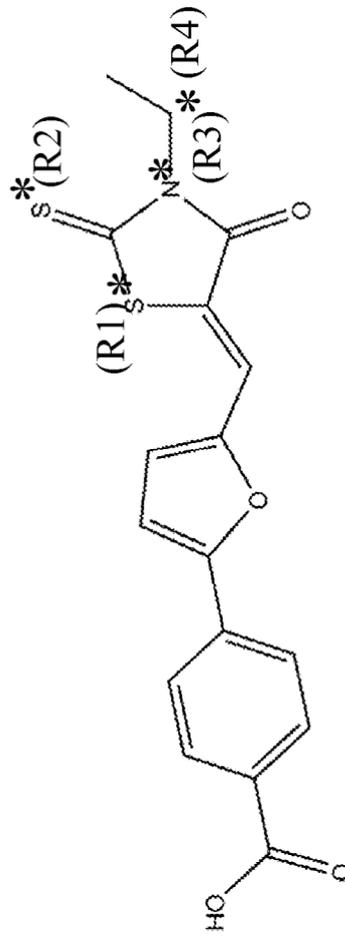
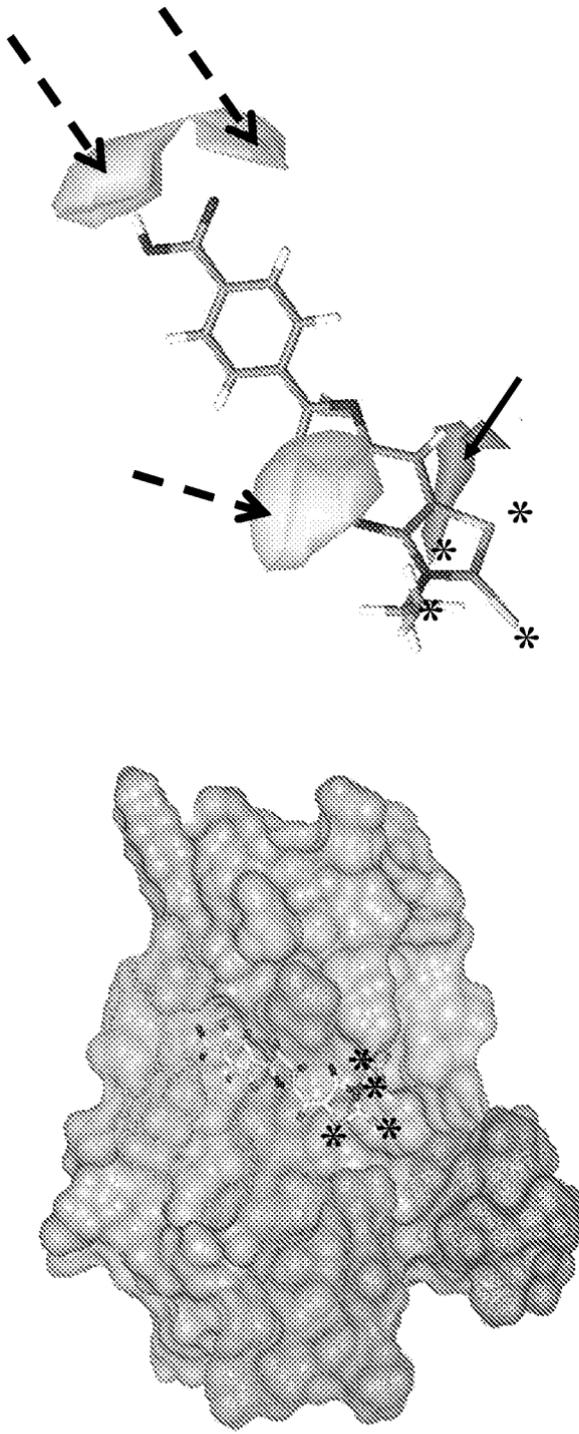


FIG. 10



ácido 4{5-[(3-etil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidin-5-iliden)metil]-2-furil} benzoico

FIG. 11

Cpd188

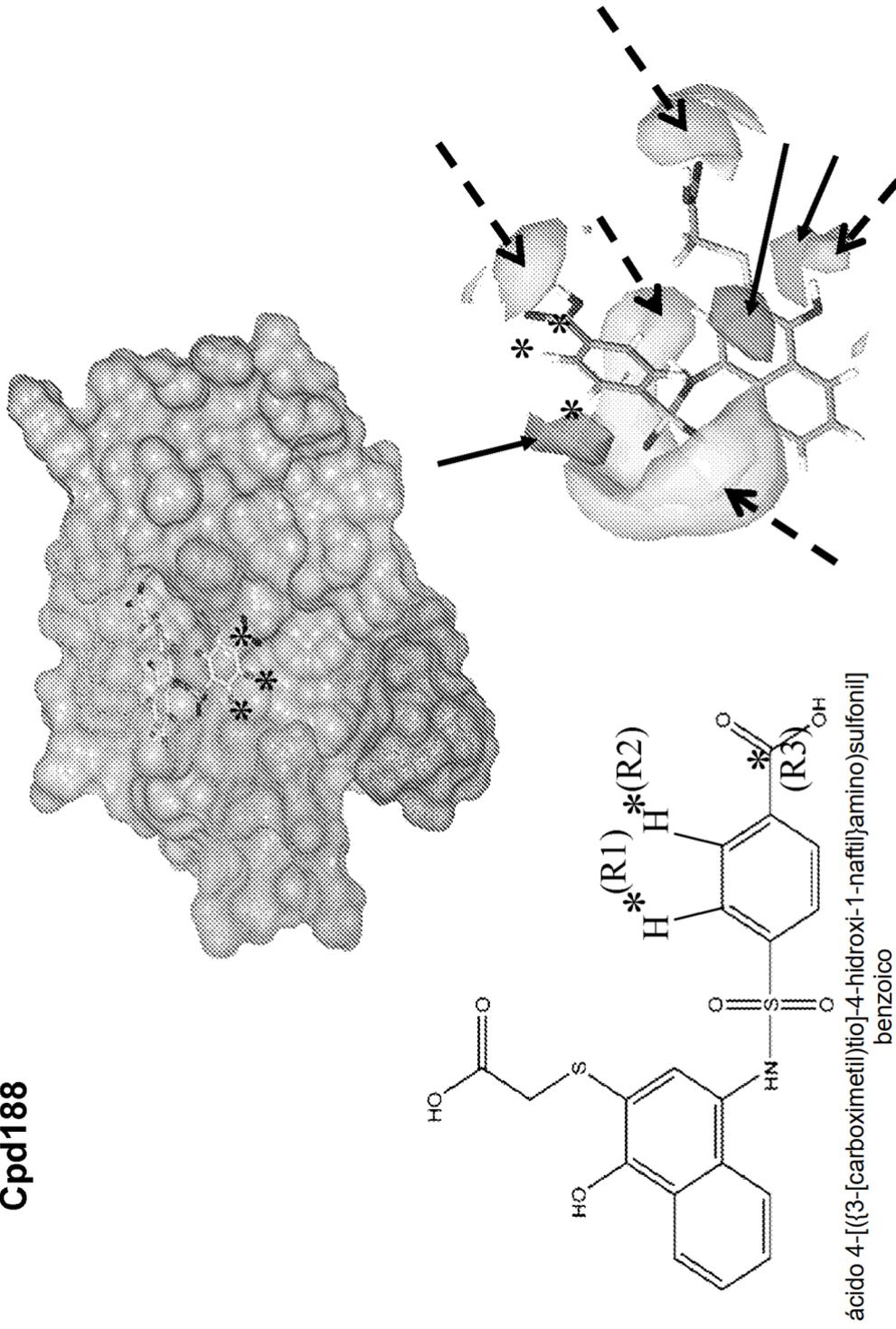


FIG. 12

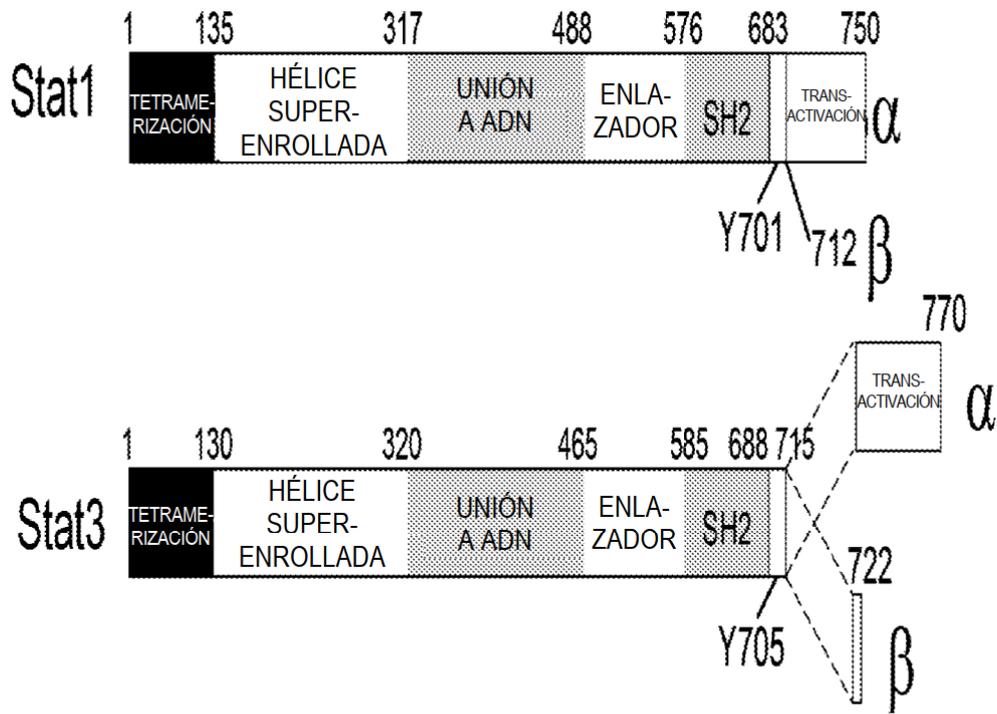


FIG. 13

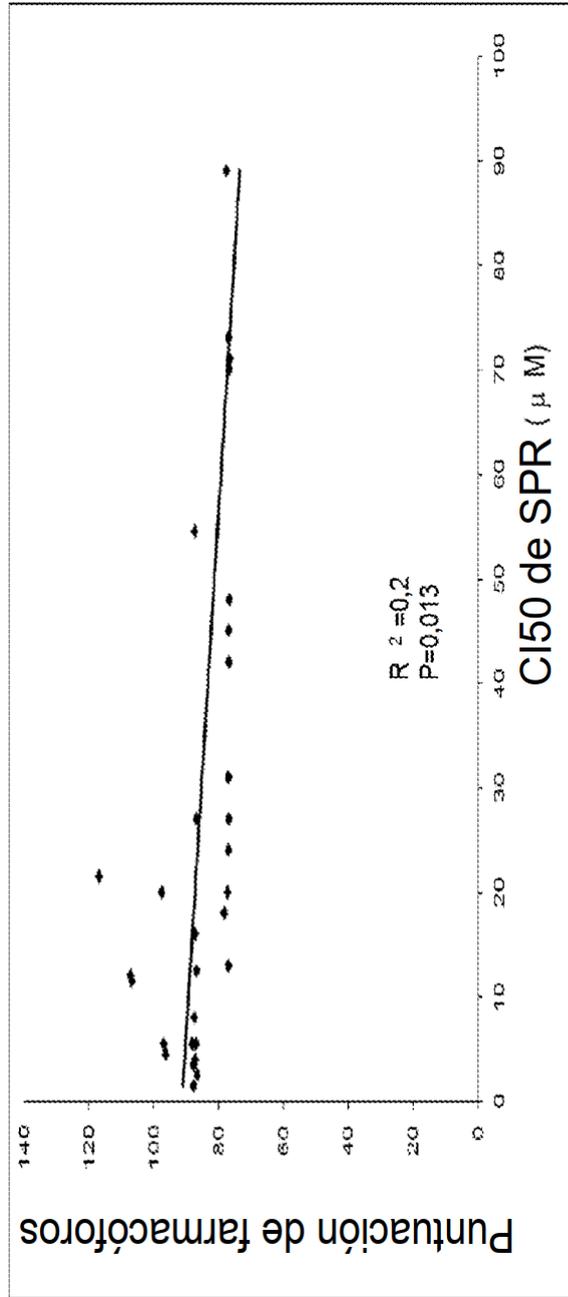
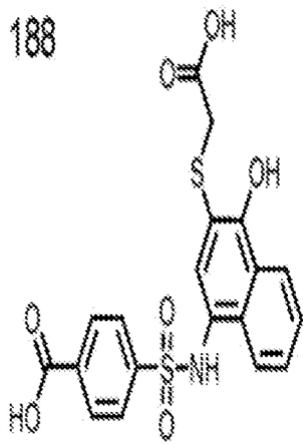
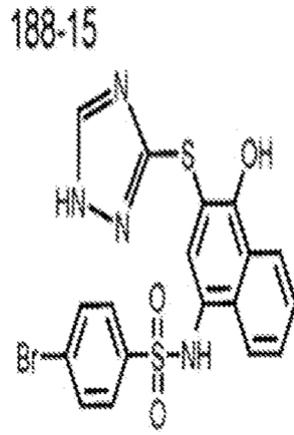


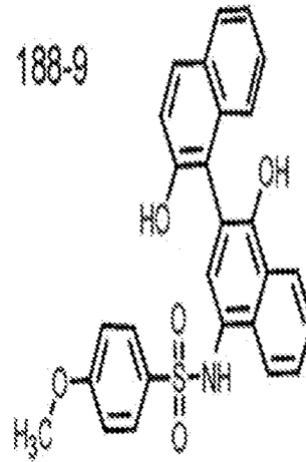
FIG. 14



Cl₅₀ de SPR= 20 μM



Cl₅₀ de SPR= 1,5 μM



Cl₅₀ de SPR= 2,5 μM

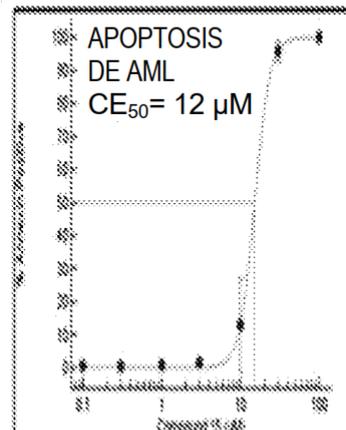
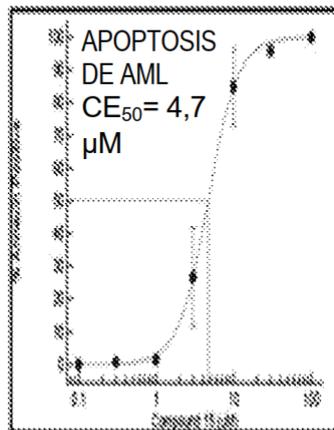
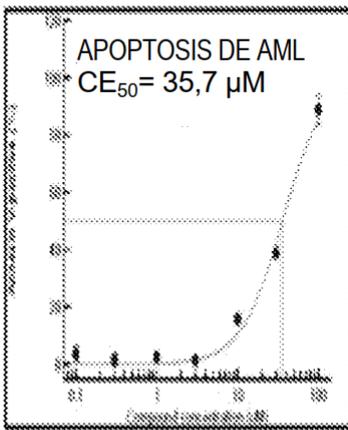


FIG. 15

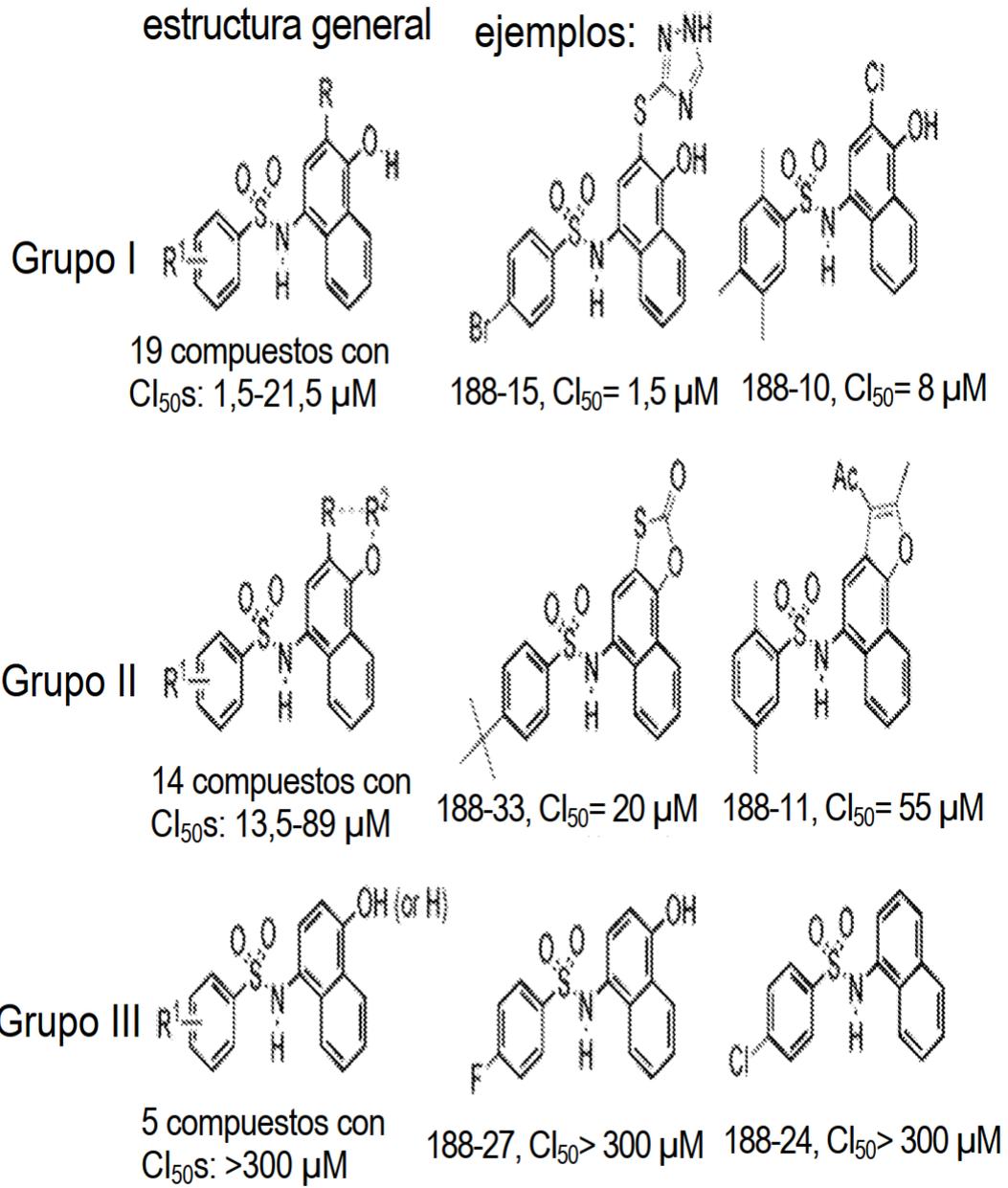


FIG. 16

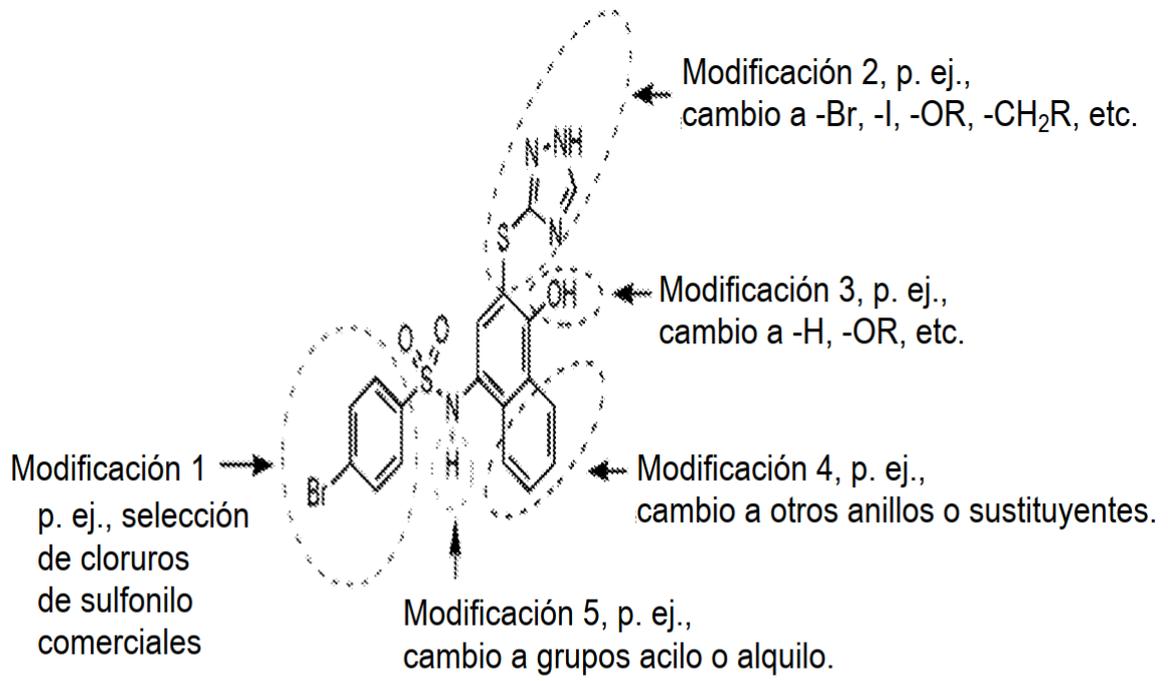


FIG. 17

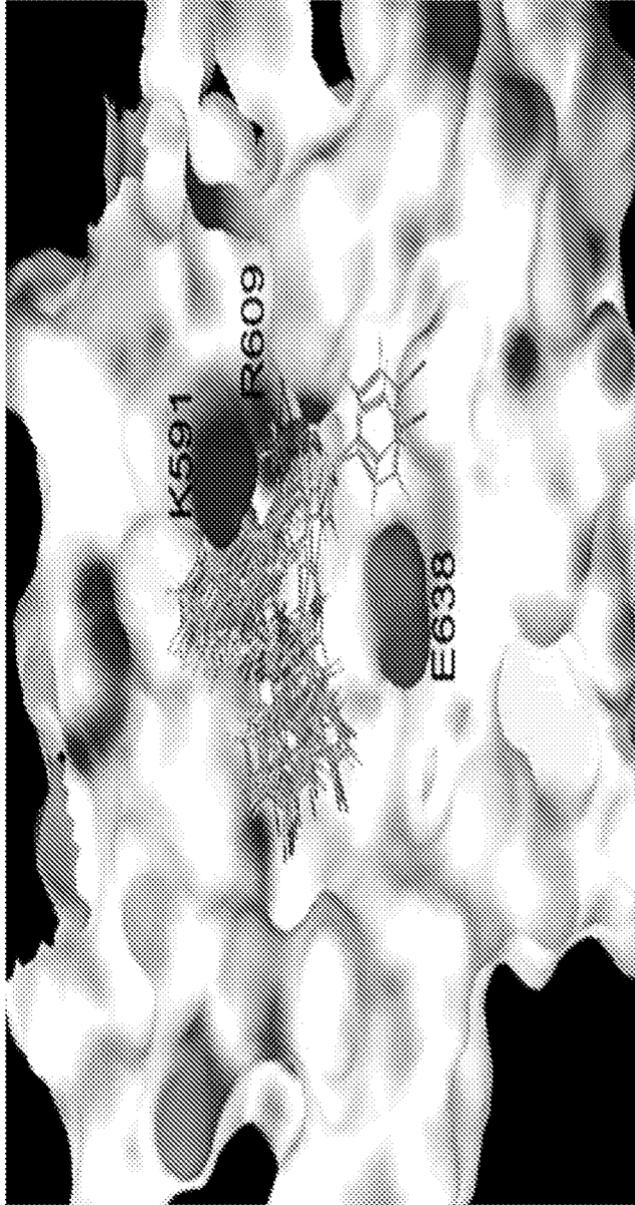


FIG. 18

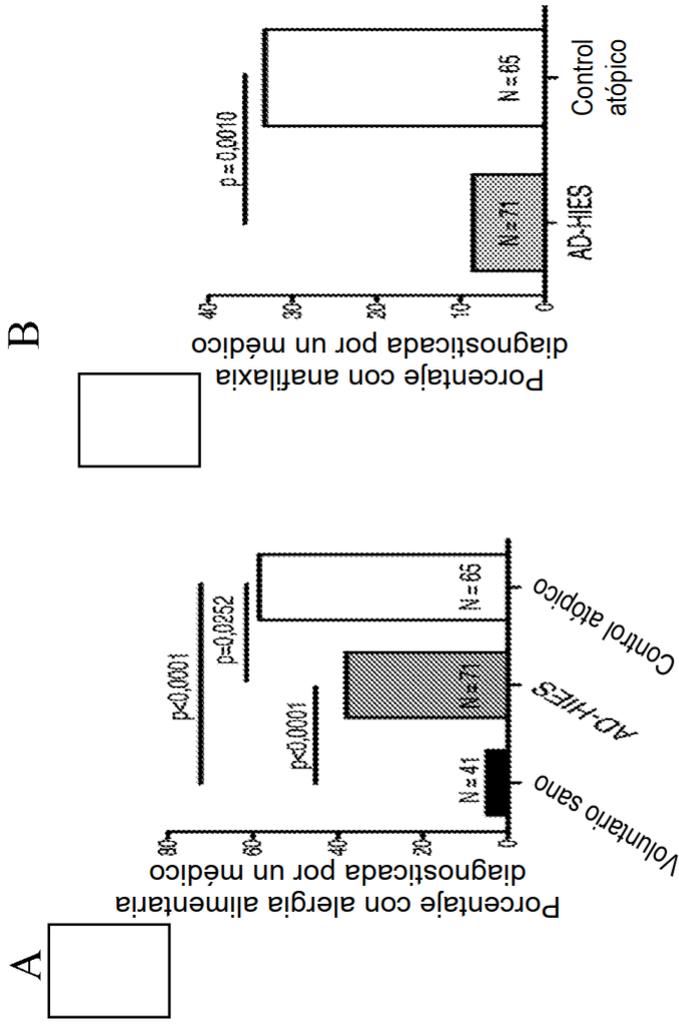


FIG. 19

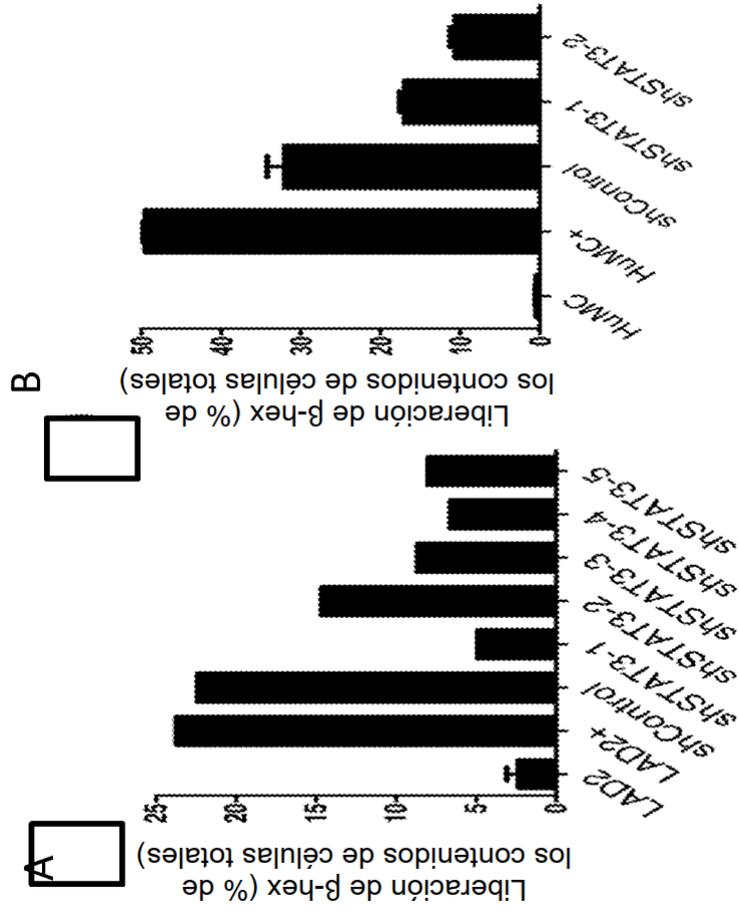


FIG. 20

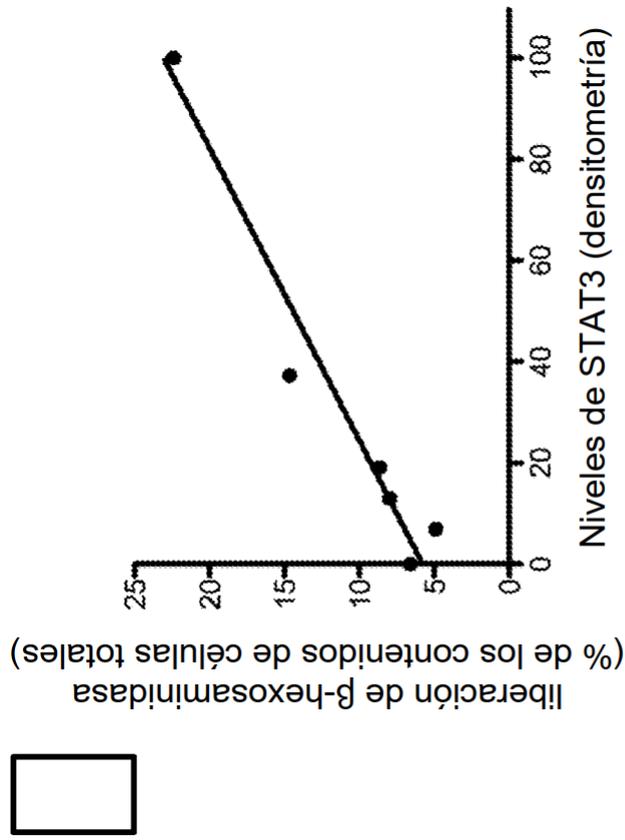


FIG. 21

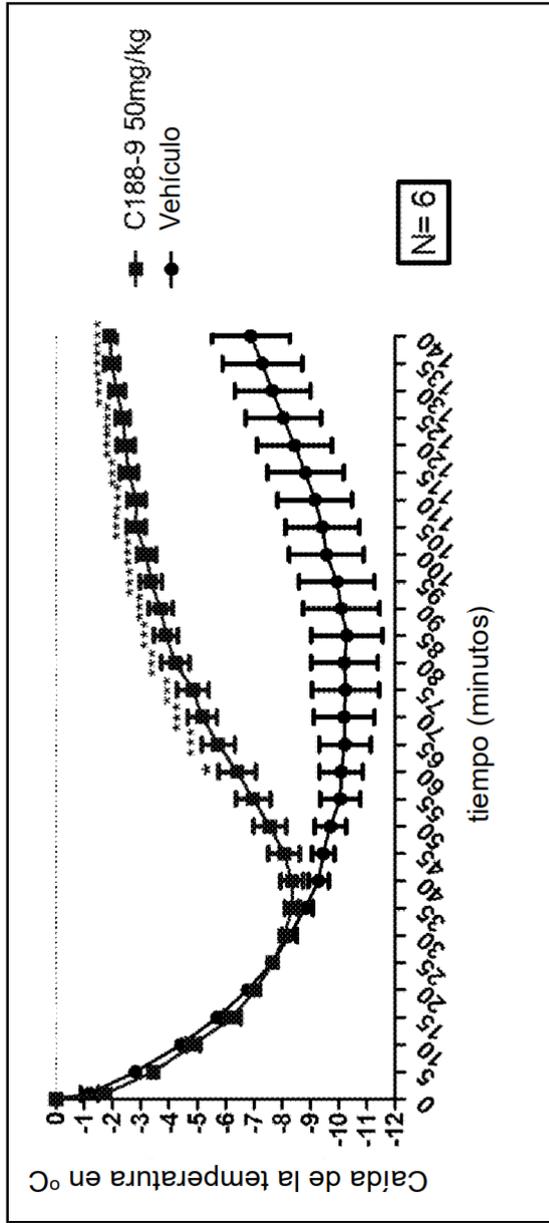


FIG. 22

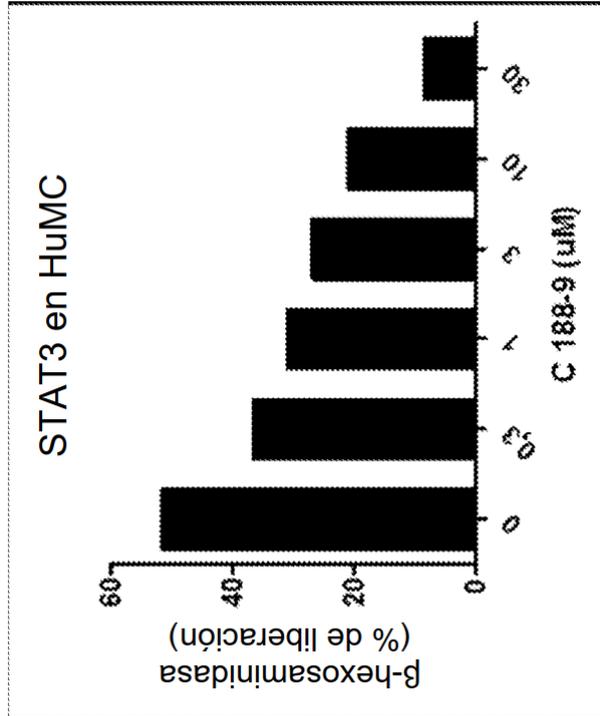


FIG. 23

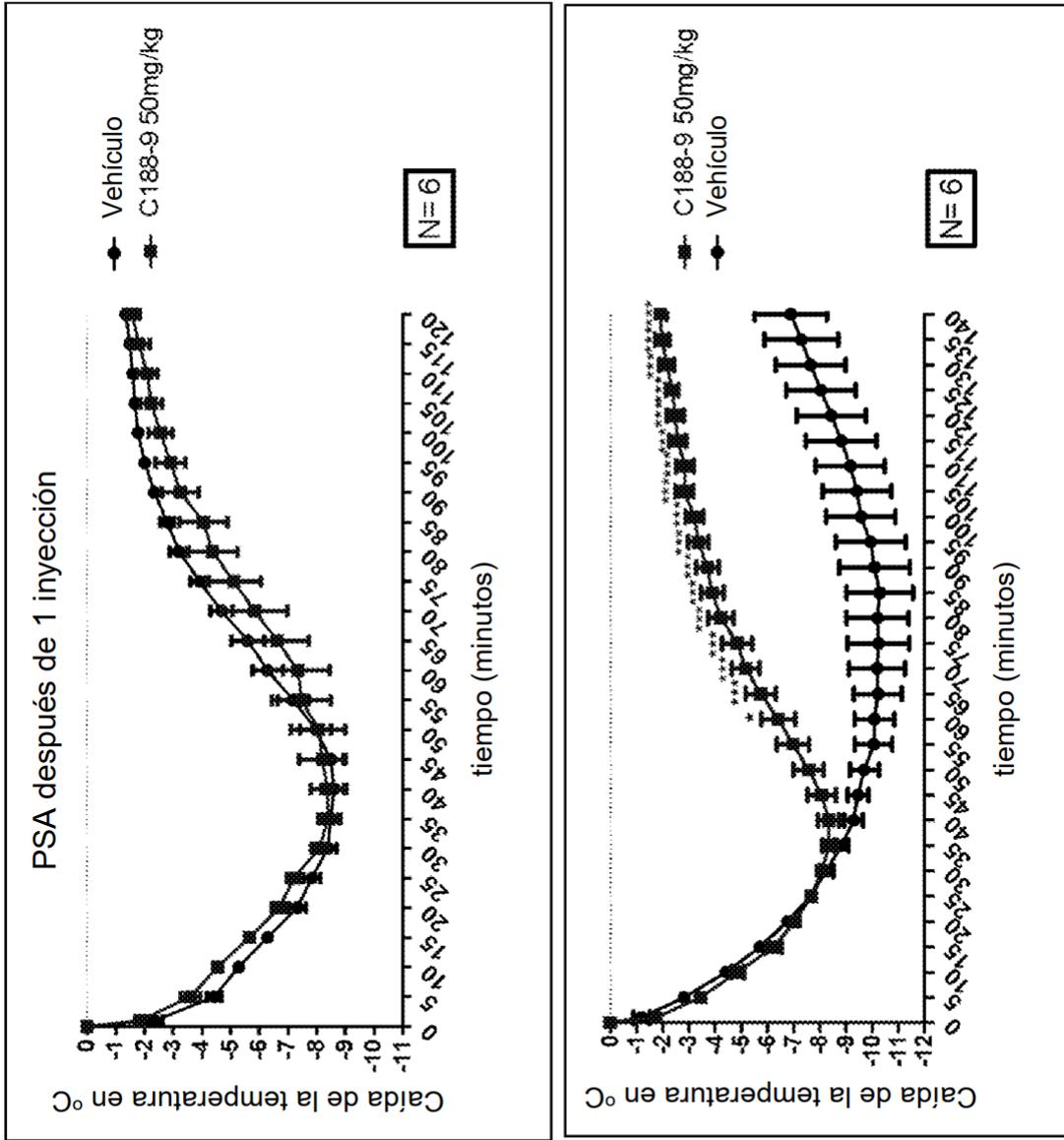


FIG. 24

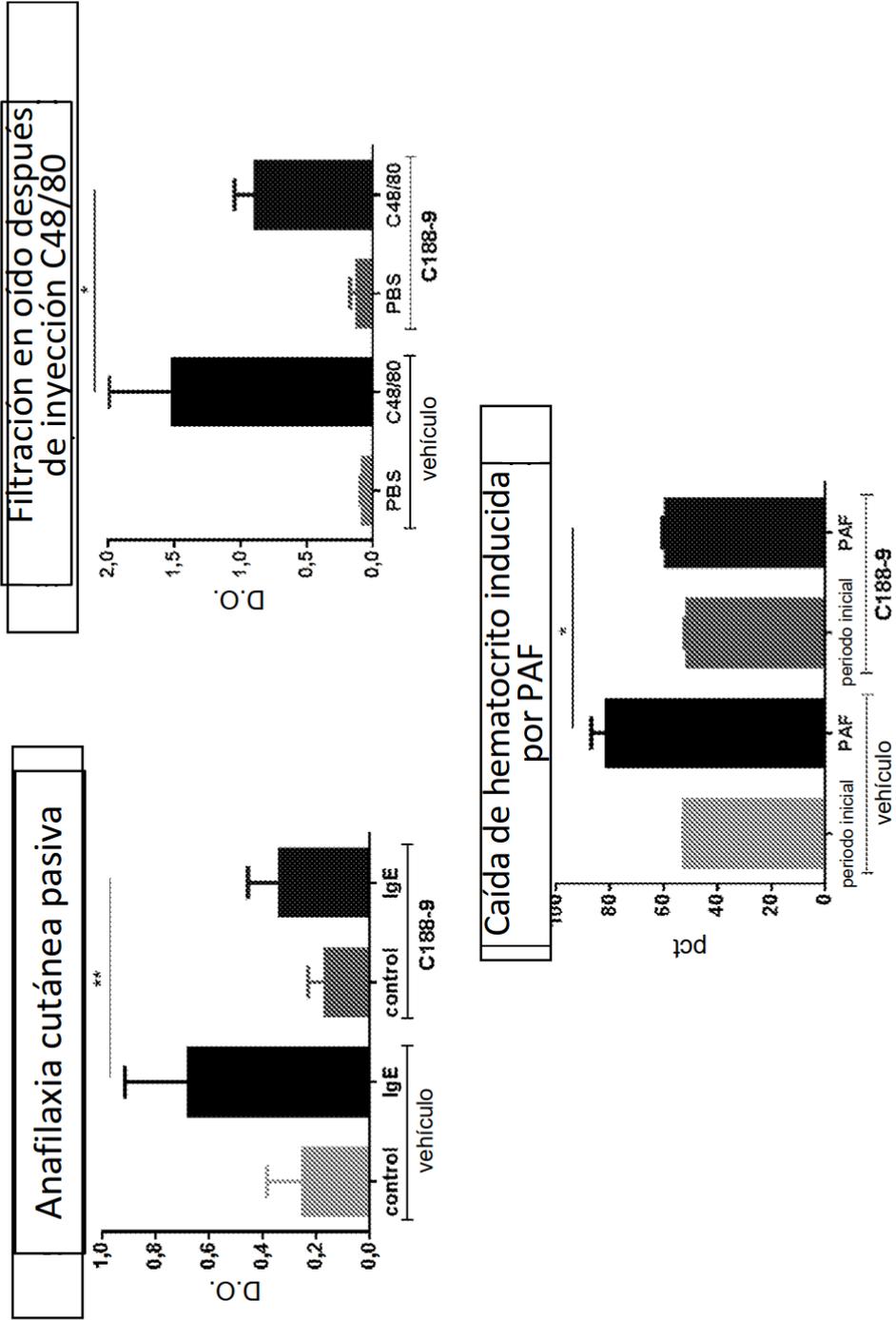
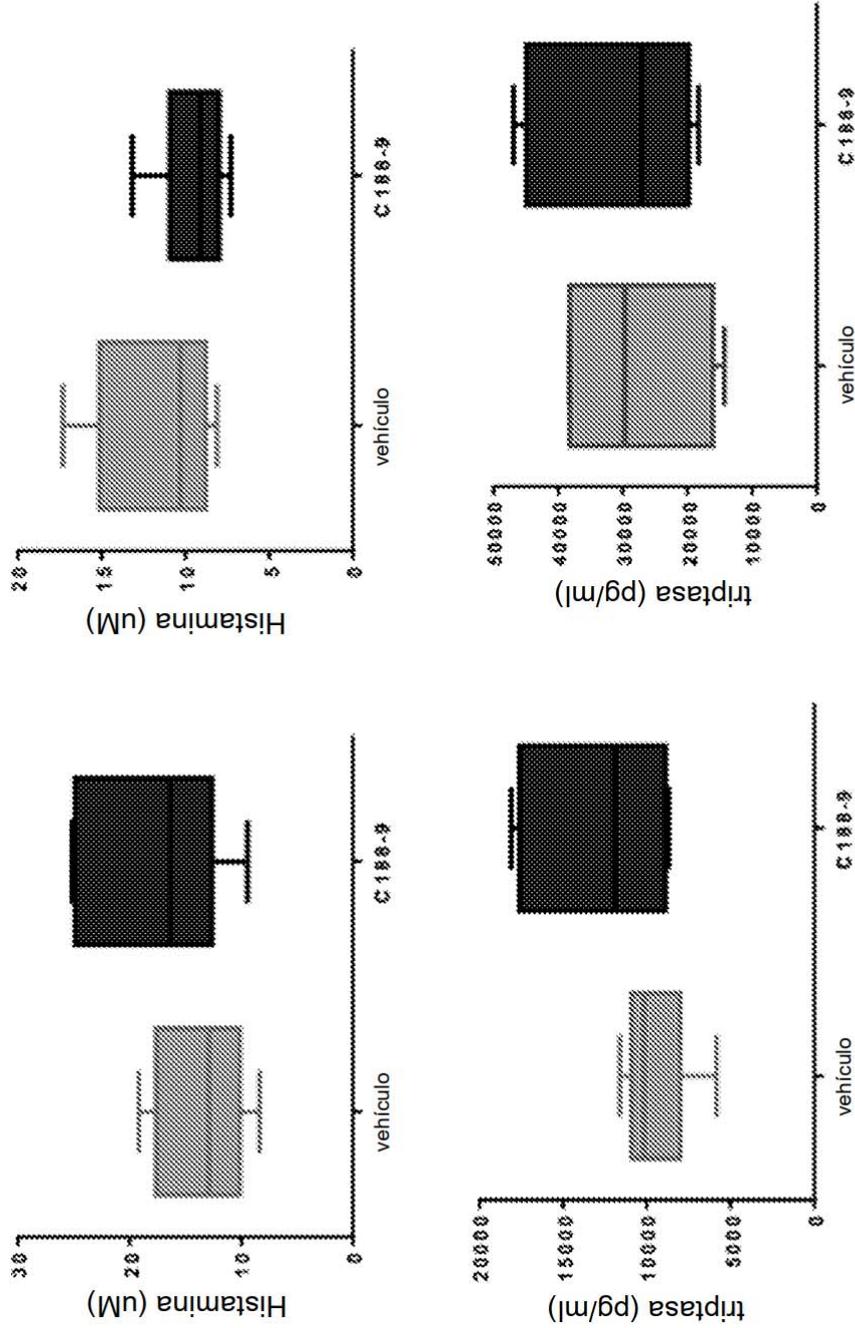


FIG. 25



Niveles de histamina y MCPT-1 séricos a los 90 s (paneles de la izquierda) o 30 min (paneles de la derecha) después de la prueba de provocación con Ag

FIG. 26

- **Dosis-Respuesta (1 semana de tratamiento)**

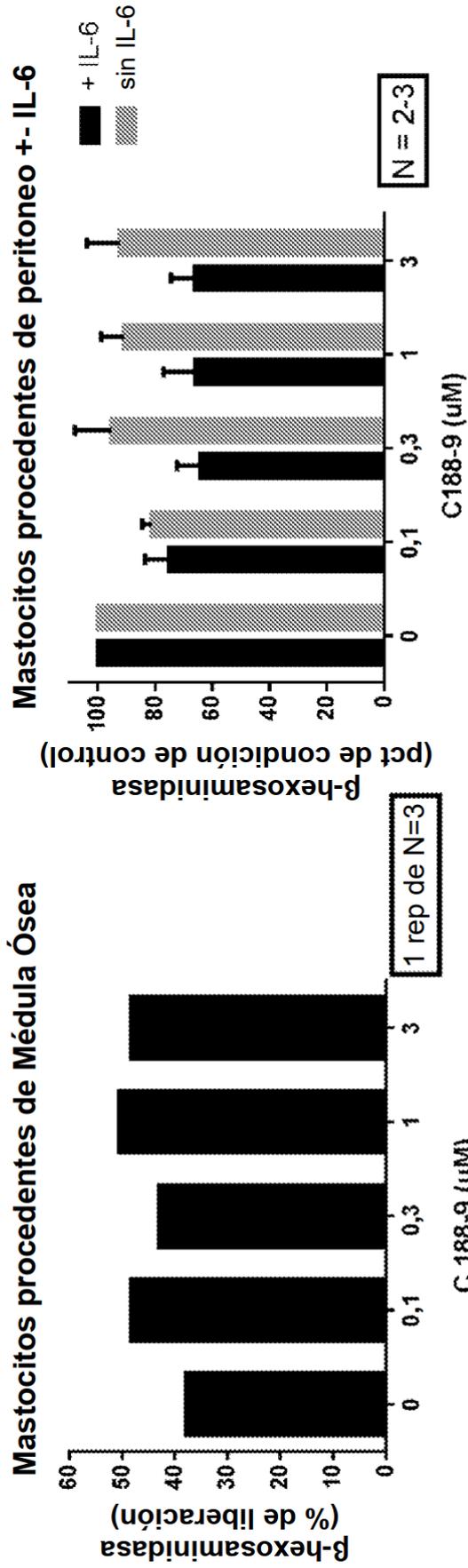


FIG. 27

Ensayo de permeabilidad Transwell

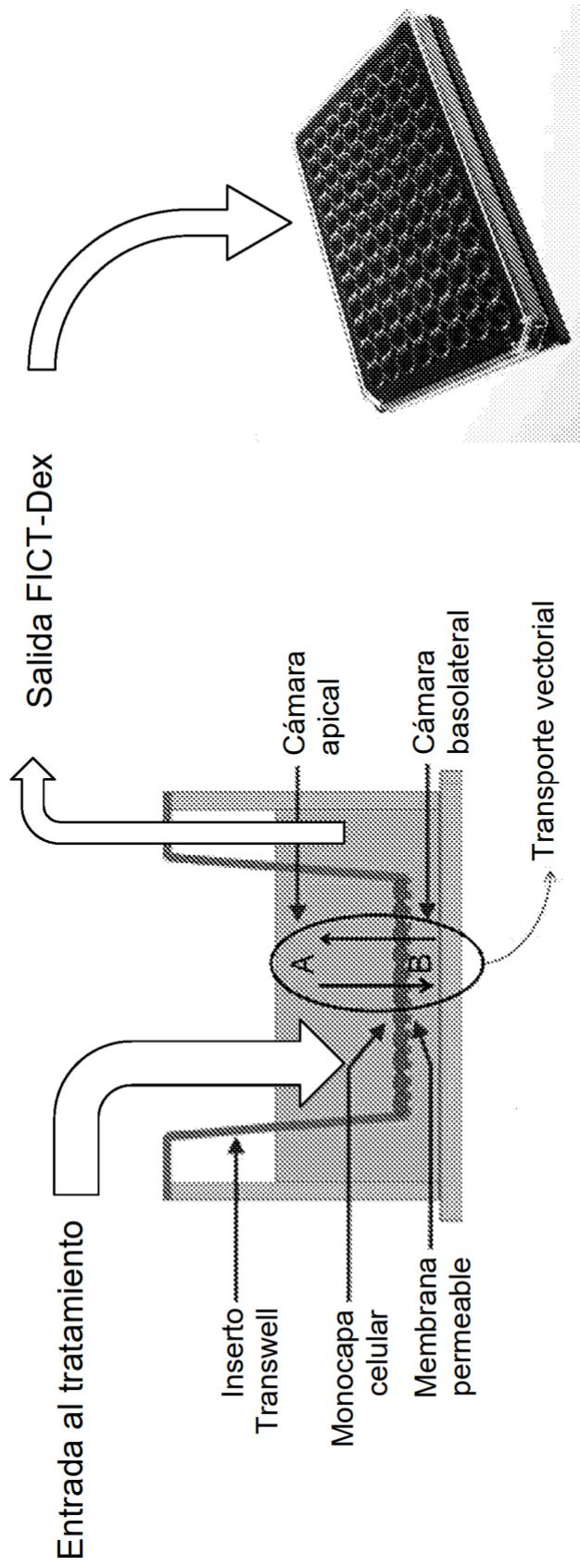


FIG. 28

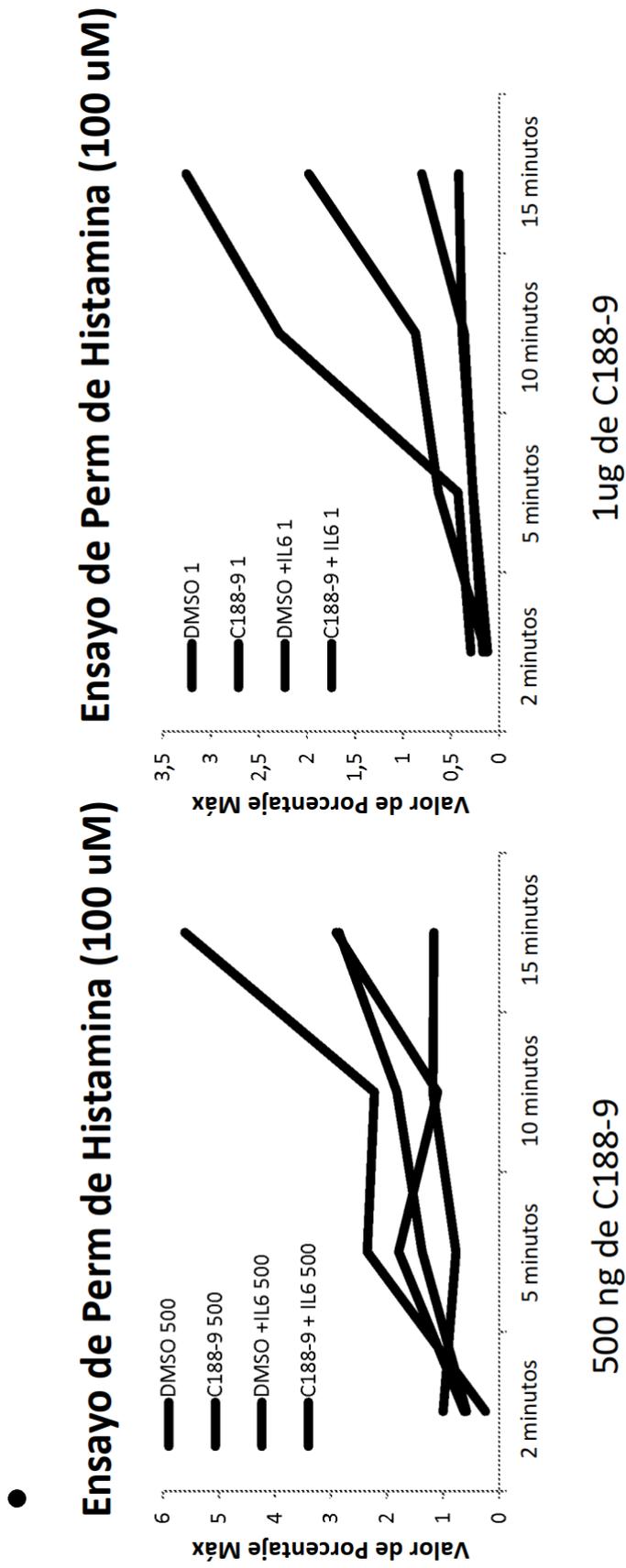
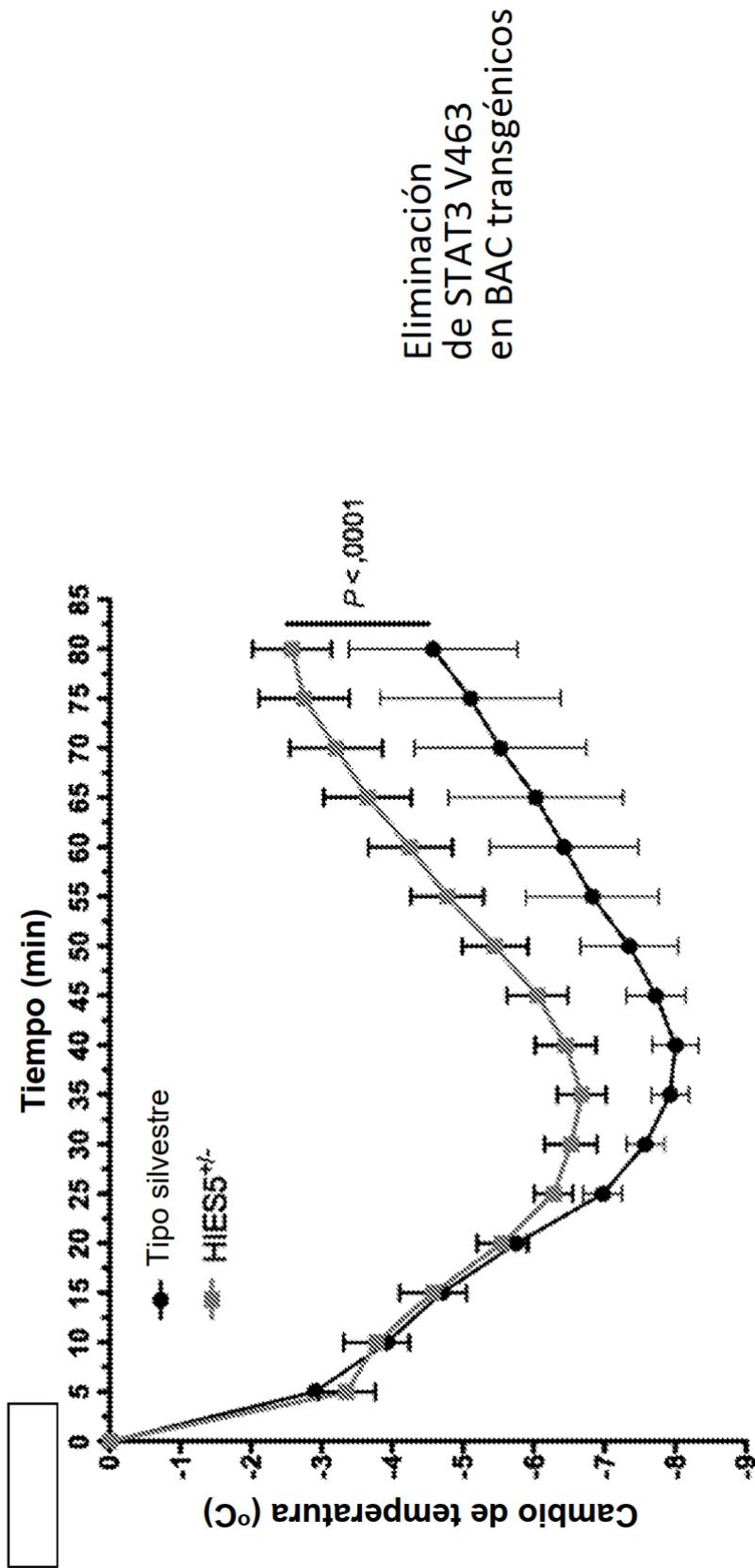


FIG. 29



Eliminación
de STAT3 V463
en BAC transgénicos

Siegel et al JACI 2013

FIG. 30

Ensayo de Perm de Histamina en HUVEC HIES6

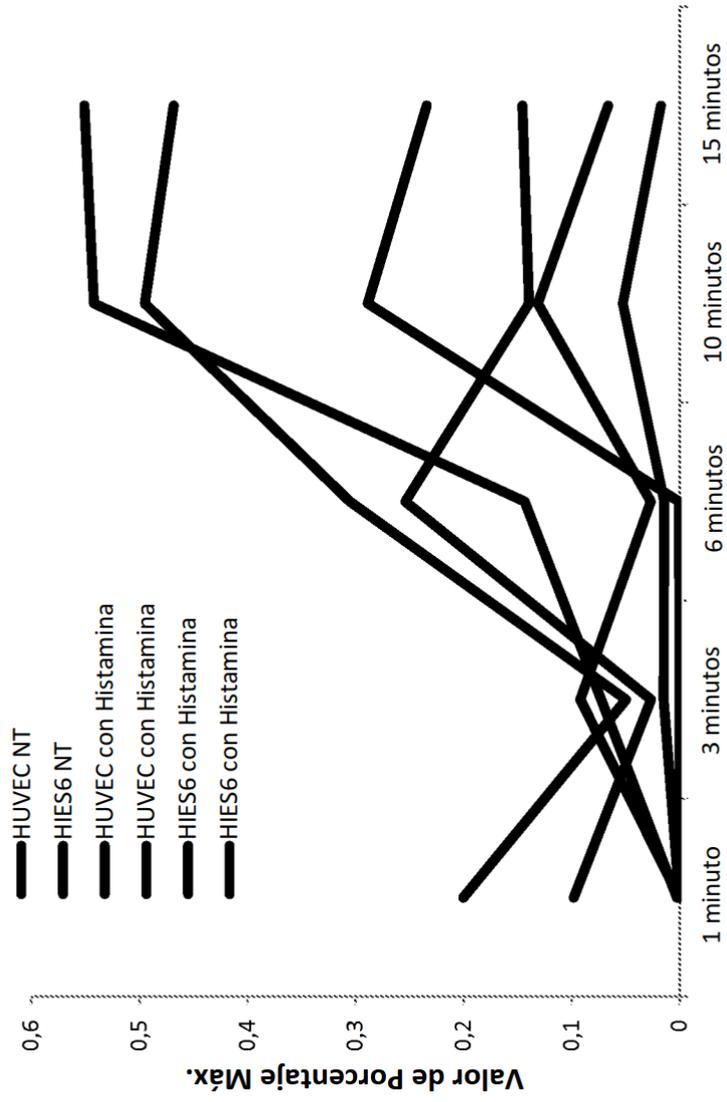


FIG. 31